

ANNALES  
DE  
L'INSTITUT PASTEUR



X

# ANNALES

DE

# L'INSTITUT PASTEUR

PUBLIÉES PAR

LA DIRECTION DE L'INSTITUT PASTEUR

Avec le concours des Chefs de Service  
et des Chefs de Laboratoire

Secrétaire général : P. LÉPINE

---

TOME SOIXANTE-SEIZIÈME

Janvier-Juin 1949

---

QR

1

A475

V. 76-77

1949

PER

MASSON ET C<sup>IE</sup>, ÉDITEURS

Libraires de l'Académie de Médecine

120, Boulevard Saint-Germain

PARIS

---

PARIS. — ANC. IMP. DE LA COUR D'APPEL, 1, RUE CASSETTE. — 1949

---



## ANNALES

DE

## L'INSTITUT PASTEUR

**MÉTHODE DE MONTAGE D'ÉLÉMENTS CELLULAIRES  
EN VUE DE L'EXAMEN AU MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE**par GEORGES BARSKI, JACQUES MAURIN et M<sup>lle</sup> ODILE CROISSANT (\*).*(Institut Pasteur, Service des Virus [D<sup>r</sup> P. LÉPINE].)*

Les progrès de la microscopie électronique ont mis à l'ordre du jour les problèmes d'examen à un très fort grossissement des cellules animales normales ou parasitées par des virus.

Porter, Claude et Fullam [2] ont, les premiers, effectué l'examen au microscope électronique d'éléments cellulaires émigrés d'un tissu en culture. On peut, à ce sujet, faire remarquer que ces auteurs ne décrivent pas un système de culture permanente et durable en milieu liquide sans plasma. Par ailleurs, ils opèrent sur une membrane en matière plastique collée au verre et qu'il est, en pratique, très difficile de détacher.

Dans le Service des Virus de l'Institut Pasteur, a été mise au point une nouvelle technique de culture de tissus sur membranes plastiques en milieu liquide. Cette méthode, appliquée d'abord à la culture du tissu épithélial [5], a été généralisée ensuite à différents tissus [4]. Elle nous sert, actuellement, de système courant de culture de tissus pour les études cytophysiologiques et la culture des virus.

Par cette méthode, il a également été possible de préparer des cultures cellulaires, infectées secondairement par des virus, en vue de les examiner au microscope électronique [4].

La technique primitive de mise en place des éléments, cellu-

(\*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 8 décembre 1948.

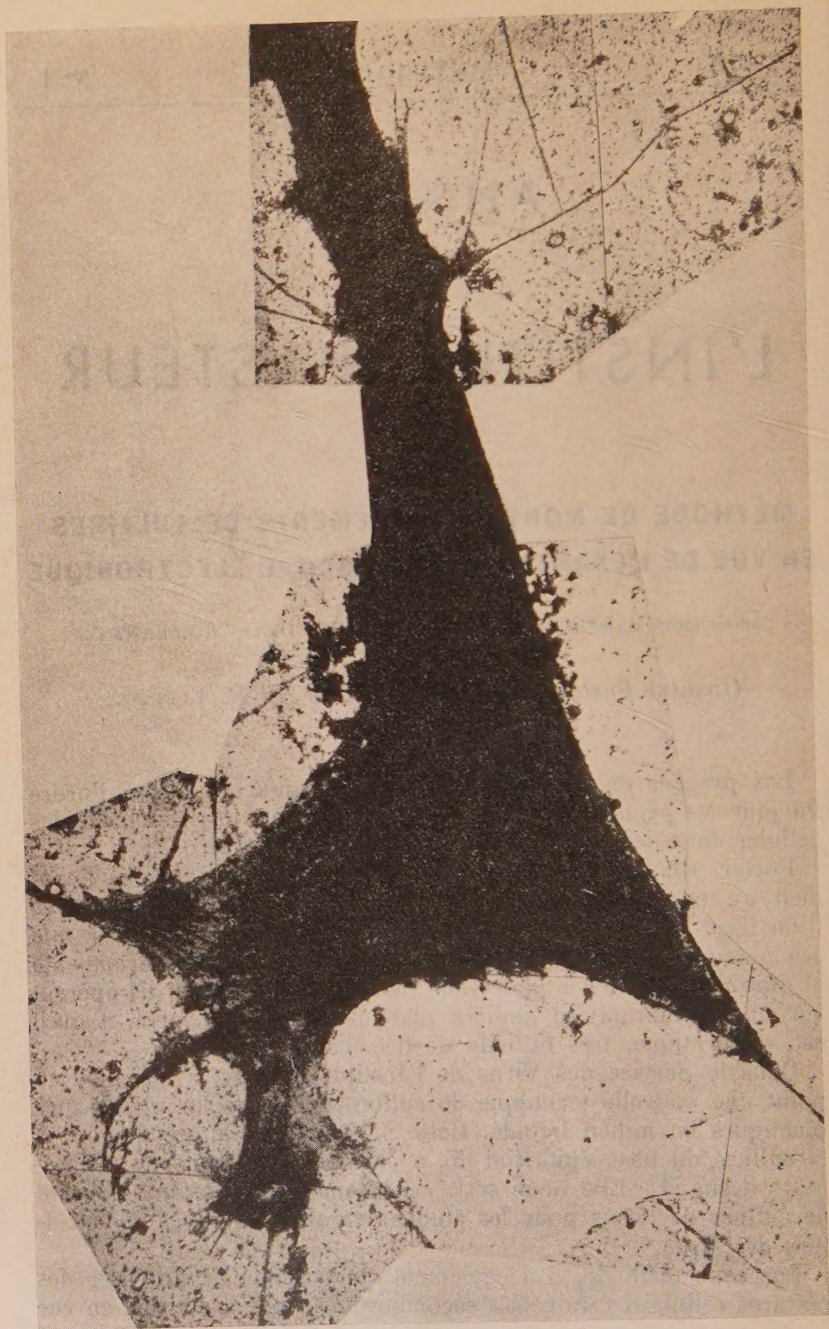


FIG. 4. — Neuroblaste de mésencéphale (embryon de poulet de treize jours) après quarante huit heures de culture. Gross. : 3.100; la transparence de certaines régions périphériques permet de distinguer un réseau fibrillaire. Le cylindraxe est opaque, même sur les bords, vraisemblablement à cause de la gaine de myéline qui absorbe l'osmium. Les filaments issus du cylindraxe à sa base ont une épaisseur de 60 m $\mu$ .



lares et autres, sur les supports spéciaux pour la microscopie électronique, a été publiée séparément [3].

Au cours des travaux ultérieurs, nous avons réalisé un certain nombre de perfectionnements, qui ont rendu la technique de montage précise, facile et beaucoup plus rapide. C'est cette nouvelle méthode que nous nous proposons de décrire ici.

En premier lieu, nous avons cherché à éliminer la difficulté du décollement de la membrane plastique de son support de verre. Dans cette intention, nous avons modifié l'opération de mise en culture.

La membrane plastique étant préparée comme indiqué dans la

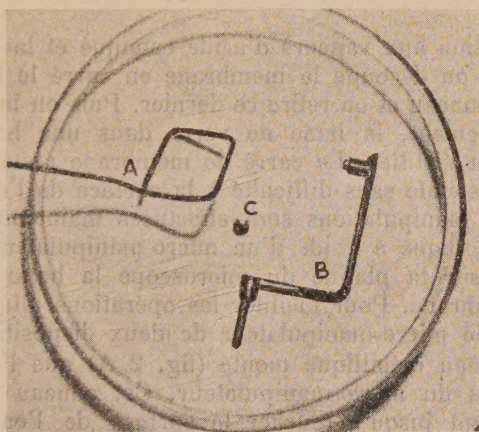


FIG. 2. — Dispositifs spéciaux s'adaptant au micro-manipulateur; A) anneau monté; B) bras coudé; C) diaphragme porte-objet du microscope électronique.

première communication [5], et recouverte de son anneau de verre carré, on commence par mettre en place avec une fine pipette les fragments de tissus explantés. Ceci fait, on prélève avec la même pipette le liquide de Ringer qui demeure par capillarité entre la membrane plastique et la lame de verre qui la supporte. Pour ce faire, au niveau d'un angle de l'anneau, à l'extérieur de celui-ci, on appuie l'extrémité de la pipette sur la membrane, qui se trouve ainsi légèrement perforée. Par cet orifice, le liquide de Ringer est facilement aspiré. De la même façon, on le remplace par le milieu nutritif, qui pénètre sous la membrane en la faisant bomber. Par la suite, les cultures étant mises à l'étuve, le liquide diffuse à travers la membrane et vient nourrir les explants.

Les avantages de cette technique sont les suivants :

1° Les explants peuvent être déposés à l'endroit choisi et s'y

fixent dans tous les cas sans changer de place, même lorsqu'il s'agit de tissu nerveux, ce qui n'était pas le cas avec la technique antérieure [4]. Cette faculté pourra éventuellement être exploitée, par exemple pour étudier l'interaction de tissus différents dans une même culture. De plus, la bonne adhérence des cultures facilite les diverses manipulations de renouvellement du milieu et de fixation.

2° La membrane plastique, constamment séparée par la couche liquide de son support de verre, n'y adhère pas et se décolle toujours facilement.

Envisageons maintenant la description du montage proprement dit des éléments de culture sur le support spécial du microscope électronique.

Après fixation aux vapeurs d'acide osmique et lavage soigneux des cultures, on découpe la membrane en carré le long du bord interne de l'anneau et on retire ce dernier. Puis on immerge lentement, obliquement, la lame de verre dans une boîte de Petri remplie d'eau distillée. Le carré de membrane restant, qui porte les cultures, s'étale sans difficulté à la surface de l'eau.

Toutes les manipulations sont effectuées maintenant sous contrôle microscopique à l'aide d'un micro-manipulateur (fig. 3).

On place sur la platine du microscope la boîte de Petri où flotte la membrane. Pour faciliter les opérations ultérieures, nous avons muni le micro-manipulateur de deux dispositifs spéciaux :

a) Un anneau métallique monté (fig. 2 A) que l'on place sur l'un des bras du micro-manipulateur. Cet anneau est descendu horizontalement jusqu'à toucher la surface de l'eau, encadrant exactement la membrane (nous avons prévu 3 anneaux, dont les diamètres différents s'adaptent aux variations de surface de la membrane). Celle-ci, qui flotte à la surface de l'eau à l'intérieur de l'anneau, peut être déplacé avec lui dans deux directions perpendiculaires, aussi facilement qu'une préparation sur le chariot d'un microscope ordinaire.

Ceci permet d'amener et d'immobiliser dans le champ du microscope la zone que l'on veut examiner au microscope électronique. Les mouvements de la surface de l'eau dus aux courants d'air, etc., n'affectent en rien la membrane, qui demeure dans la position choisie.

b) Un bras coudé en laiton (fig. 2 B) qui s'adapte à un autre bras du micro-manipulateur, en regard du premier. Ce bras porte à son extrémité libre un orifice entouré d'un rebord circulaire en margelle de puits, que l'on coiffe du support spécial pour le microscope électronique, appelé diaphragme porte-objet. Il est ainsi très facile d'immerger ce diaphragme en dehors de la surface de l'anneau, puis de l'amener sous la membrane et, enfin, de le faire remonter de telle façon que son orifice reste exacte-





Digitized by the Internet Archive  
in 2024

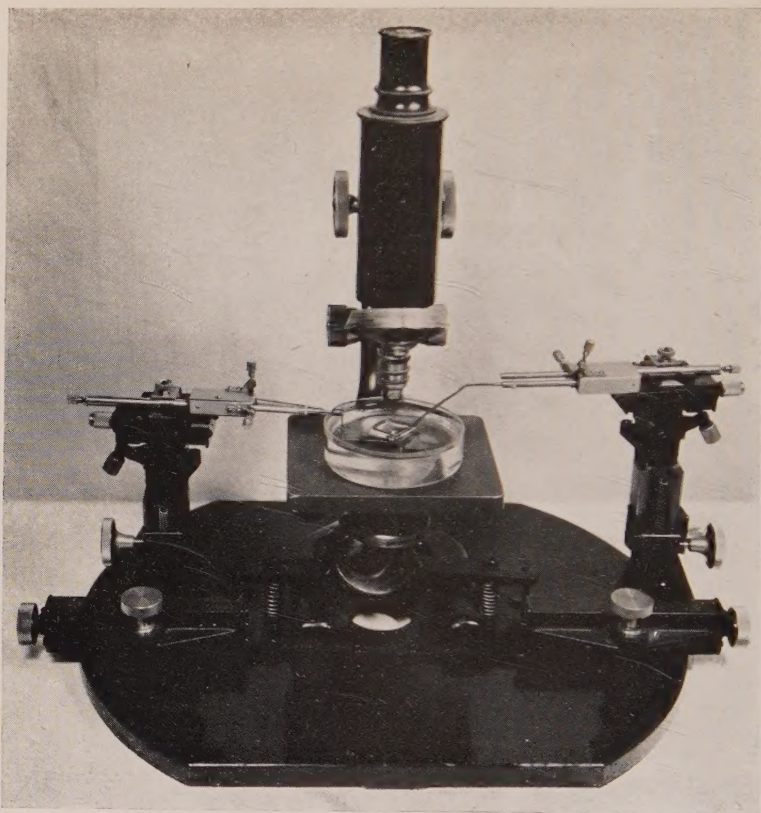


FIG. 3. — Ensemble du micro-manipulateur monté avec ses accessoires.



FIG. 4. — Fragment d'un autre neuroblaste de même origine que celui de la figure 1. Un meilleur étalement de la cellule permet d'observer plus de détails. On distingue notamment des filaments primaires plus épais et des travées secondaires (Cajal). *En bas et à gauche* : prolongement dendritique laissant parfaitement voir son réseau. *A droite* : base du cylindraxe.



ment en-dessous de l'élément cellulaire choisi, qu'il finit par « cueillir » avec une grande précision.

La membrane ayant été découpée tout autour du diaphragme, ce dernier est retiré du bras coudé et mis à sécher en attendant l'examen.

Le microscope électronique à lentilles électrostatiques que nous employons est de construction française (marque C. S. F.). L'accélération des électrons est maintenue à 40 Kv.

L'application de cette technique nous a permis d'améliorer les possibilités d'étude des éléments histologiques au microscope électronique, en particulier l'examen du tissu nerveux en culture. En adaptant le temps de fixation au tissu, et en choisissant des cellules bien étalées, nous avons pu obtenir des images suffisamment transparentes pour permettre d'observer les détails cyto-logiques.

Les photographies (fig. 1 et 4) laissent voir une structure interne, en particulier des fibrilles, ainsi que de très fines ramifications des fibres nerveuses (50 à 100 m $\mu$  environ de largeur).

La même technique de micromanipulation sert aussi à l'examen d'éléments cellulaires prélevés *in vivo*. On effectue des étallements et des touches sur des membranes disposées comme pour la culture. En amenant la membrane avec le matériel à la surface de l'eau, nous faisons le choix des éléments cellulaires et leur fixation sur le porte-objet du microscope électronique, exactement de la façon décrite ci-dessus. Ainsi, nous arrivons à obtenir des préparations, pour la microscopie électronique, d'éléments cellulaires provenant directement de l'organisme vivant.

Signalons enfin qu'une légère coloration vitale peut faciliter le choix des éléments présentant une structure intra-cellulaire intéressante. Le colorant est ensuite facilement éliminé par un séjour dans l'eau distillée.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] BARSKI (G.) et MAURIN (J.). *Ces Annales*, 1948, **74**, 312.
- [2] PORTER (K. R.), CLAUDE (A.) et FULLAM (E. F.). *J. exp. Med.*, 1945, **81**, 233.
- [3] WIRTH (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1947, **225**, 899.
- [4] WIRTH (J.), ATANASIU (P.), BARSKI (G.) et CROISSANT (M<sup>lle</sup> O.). *C. R. Acad. Sci.*, 1947, **225**, 827.
- [5] WIRTH (J.) et BARSKI (G.). *Ces Annales*, 1947, **73**, 987.

## MICRODOSAGE DU BROME DANS UN COMPOSÉ ORGANIQUE

par ANDRÉ DESASSIS et MICHEL MACHEBOËUF.

*(Institut Pasteur. Laboratoire de Chimie biologique.)*

Au cours de recherches biochimiques nous avons voulu suivre le devenir d'un acide gras dans une réaction où il se trouvait en présence de substances organiques diverses et en particulier de lipides. Nous avons pensé utiliser pour cela un acide gras marqué par bromuration : l'acide choisi fut l'acide dibromo 9-10 stéarique. Les quantités de brome que nous avions à doser se situaient entre 0,1 et 1 mg. Les techniques habituelles de dosage du brome ne se sont pas révélées suffisamment précises ou bien leur mise en œuvre nécessitait des opérations trop longues pour qu'un travail en séries soit possible. Nos échantillons contenaient très peu de chlorure (jamais plus de 0,1 mg. de Cl) et ceci facilitait notre travail.

Nous nous abstenons de faire ici une étude historique du microdosage du brome, car de bonnes revues critiques ont été publiées sur ce sujet [1, 2]. Les techniques qui y sont conseillées s'appliquent à des cas différents de celui que nous envisageons.

Le brome dans nos essais est à l'état de dérivé bromé d'une chaîne grasse ; pour le doser, il fallait d'abord le transformer en ions bromes. Pour cela, nous avons tenté de faire une minéralisation par calcination en présence d'alcalis ou bien une destruction des matières organiques par oxydation très énergique (sulfochromique ou sulfopermanganique) avec récupération des produits volatils. Ces principes ne nous ont pas conduits à réaliser une technique simple et parfaitement quantitative. Nous avons donc essayé d'arracher le brome aux acides gras par l'action de l'éthylate de sodium à chaud. Les résultats ne furent pas encore parfaits. Finalement, le moyen qui s'est révélé le meilleur est l'action de sodium métallique en présence d'alcool absolu et à chaud.

Ainsi tout le brome passe à l'état de bromure sans aucune perte par volatilisation.

Ceci fait, nous avons cherché une technique de dosage colorimétrique des ions  $\text{Br}^-$ . Nous avons d'abord essayé la réaction



de Denigès et Chelle [3] qui est une magnifique réaction qualitative ; mais les résultats quantitatifs ne furent pas parfaits pour les quantités de brome que nous avions à doser. Les autres techniques classiques (en particulier celles qui utilisent la fluorescéine) nous ont donné de moins bons résultats encore. Nous avons finalement eu satisfaction en mettant en œuvre une réaction colorée décrite il y a un peu plus de vingt ans par Walter [4]. Weichbrodt et Bieling [5] qui avaient étudié cette réaction lui firent des critiques, mais nous verrons qu'avec diverses précautions, elle est parfaitement applicable au cas qui nous intéresse et nous avons pu, grâce à elle, mettre au point une technique commode et rapide donnant une bonne précision.

#### TRANSFORMATION DU BROME ORGANIQUE EN BROMURE.

Les acides gras que nous avons à étudier se trouvent avec d'autres lipides en solution dans du chloroforme. Ce solvant réagirait avec le sodium, il faut donc l'éliminer avec soin ainsi que les petites quantités d'eau qui pourraient être présentes. La solution chloroformique est placée dans un ballon dont le col rodé peut s'adapter à un réfrigérant. On chasse le chloroforme par évaporation puis on place le résidu dans un dessiccateur à vide jusqu'à poids constant. On ajoute alors 5 ml. d'alcool absolu puis environ 0,2 g. de sodium. Le sodium n'est pas pesé, on se contente de découper une lame de métal de 2 mm. d'épaisseur environ, dans laquelle on prélève un fragment de 1 cm<sup>2</sup> de surface (1). Aussitôt, on adapte sur le ballon un réfrigérant ascendant et l'on plonge le ballon dans un bain-marie bouillant. Après quinze minutes, tout le brome est à l'état d'ions Br<sup>-</sup>.

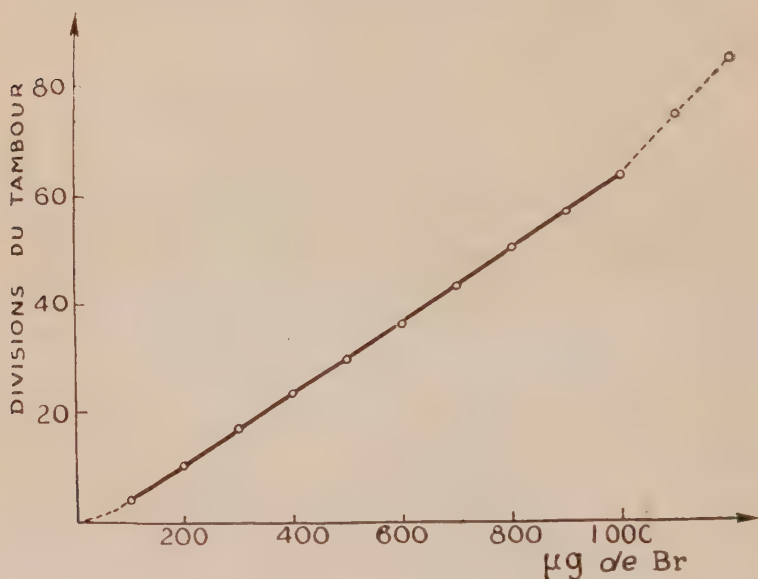
On obtient ainsi une solution alcoolique plus ou moins colorée en jaune et contenant un excès d'éthylate de sodium, des savons et divers produits de transformation des lipides qui étaient présents dans l'extrait chloroformique. Nous étudierons plus loin l'influence que peuvent avoir ces substances sur le dosage des ions Br<sup>-</sup> et nous rechercherons le moyen d'éviter les erreurs qui pourraient en résulter.

#### RÉACTION COLORÉE DE WALTER.

Une solution aqueuse de bromure donne, par addition d'un peu de chlorure d'or, une teinte jaune orangée. Nous n'avons pas

(1) Le sodium avait été conservé en gros blocs dans du pétrole ; on lave donc le fragment découpé dans un peu d'éther de pétrole avant de le jeter dans l'alcool absolu.

trouvé dans la littérature de renseignements sur le mécanisme de cette réaction. Pour étudier ses modalités, nous avons utilisé une solution aqueuse de KBr pur à 297,5 mg. par litre, ce qui correspondait à 200  $\mu\text{g}$  de Br par millilitre. Cette teneur fut vérifiée par titrimétrie au moyen de solutions titrées de  $\text{AgNO}_3$  et de  $\text{KSCN}$ . Notre solution étalon de chlorure d'or avait une concentration de 0,5 p. 100. Pour effectuer les lectures électrophotométriques des expériences préliminaires, nous avons utilisé l'ancien modèle de l'appareil de Meunier (modèle à 4 écrans), avec l'écran bleu.



Pour le travail définitif, nous avons utilisé le modèle récent à 8 écrans dont l'écran n° 43 fut le plus favorable. Nous opérions les mélanges dans des tubes jaugés à 10 ml. de façon à compléter toujours à un même volume. Walter employait des quantités de chlorure d'or beaucoup trop grandes (0,2 ml. par centimètre cube de solution); nous avons constaté que pour les masses de brome que nous avions à doser (entre 100 et 1.000  $\mu\text{g}$  de Br), il suffit largement de 0,5 ml. de la solution aurique pour 10 ml. de solution totale. Ainsi les témoins sans brome sont peu teintés et donnent seulement des lectures de l'ordre de 25 divisions du tambour gradué de l'appareil de Meunier.

Nous avons vérifié que la coloration atteignait son maximum d'intensité en moins de cinq minutes et que la teinte restait ensuite stable pendant plus de vingt-quatre heures à la température ordi-



naire, aussi bien à la lumière du jour qu'à l'obscurité. Les variations normales de la température ambiante sont sans influence.

La réaction est applicable pour un dosage électrophotométrique car les points expérimentaux se rangent parfaitement sur une droite entre 100 et 1.000  $\mu\text{g}$  de brome.

Dans la figure n° 1 les ordonnées correspondent aux divisions du tambour de l'appareil de Meunier et les abscisses aux quantités de brome en  $\mu\text{g}$ . Le chiffre obtenu pour le témoin sans brome étant déduit dans chaque cas.

La courbe s'infléchit légèrement pour les doses de brome trop élevées (au-dessus de 1.000  $\mu\text{g}$ ) ou trop basses (au-dessous de 100  $\mu\text{g}$ ).

En somme, dans le cas d'une solution aqueuse de bromure de potassium pur, la réaction est applicable au dosage dans les limites qui nous intéressent mais il était possible que les matières présentes dans nos échantillons troublent la réaction colorée. La soude provenant de l'éthylate de sodium pouvait être un facteur important, aussi nous avons étudié son influence sur la réaction colorée.

*Influence de l'alcalinité.* — L'alcalinité trouble profondément la réaction. En voici la preuve dans une expérience effectuée sur 500  $\mu\text{g}$  de Br avec l'écran bleu de l'ancien modèle de l'appareil de Meunier.

NOMBRE DE GOUTTES DE NaOH N/10 ajoutées	LECTURES SUR L'APPAREIL de Meunier (blanc déduit).
0	28
1	18
2	11
3	3
4	0
5	0

Il était donc nécessaire, dans nos dosages, de neutraliser la soude provenant de l'éthylate de sodium. Mais les sels de sodium pouvaient gêner eux aussi.

**INFLUENCE DES SELS.** — a) *Chlorure de sodium* : Le chlorure de sodium ajouté à doses importantes trouble profondément la réaction. Voici quelques chiffres à ce sujet :

Le chlorure de sodium à forte concentration bloque complètement la réaction. En présence de 4 p. 100 de ce sel par exemple, il se produit une légère teinte jaune, même sans brome et cette teinte ne s'intensifie pas par addition de bromures.

MILLILITRE DE NaCl A 20 p. 100 AJOUTÉS à 10 ml. d'une solution contenant 500 $\mu$ g. de Br	LECTURE SUR L'APPAREIL de Meunier (blanc déduit)
0	30
1	23
2	21
3	20
4	20
5	19

Expériences effectuées dans une solution de NaCl à 4 p. 100 :

QUANTITÉ DE Br	LECTURES (BLANC NON DÉDUIT)
0	43
500 $\mu$ g.	43
700 $\mu$ g.	44

Par conséquent, le dosage du Br serait impossible en présence des quantités de ClNa telles que celles que produirait la neutralisation de la soude par HCl. Mais le chlore est un halogène comme le brome et il se pouvait que d'autres anions ne gênent pas la réaction. Nous avons essayé le sulfate de sodium.

b) *Sulfate de sodium* : Le sulfate de sodium, même à concentration assez grande, n'empêche pas la réaction. Voici quelques chiffres prouvant ce fait (pour 400  $\mu$ g de Br) :

TENEURS EN SULFATE DE SODIUM	LECTURES (BLANC DÉDUIT)
0 p. 100	22
3 p. 100	26
6 p. 100	26
7,5 p. 100	26
15 p. 100	25

Nous avons donc pensé à neutraliser la soude dans nos dosages par de l'acide sulfurique, mais la neutralisation exacte pouvait être nécessaire si l'acidité influait sur la réaction. Nous avons donc examiné l'influence de l'acide sulfurique. Une solution de bromure contenant 15 p. 100 de sulfate de sodium fut étudiée comparativement en présence de quantités variables d'acide sulfurique.



GOUTTES DE $\text{SO}_4\text{H}_2$ CONCENTRÉ ajoutées dans 10 ml. de mélange	LECTURES SUR L'ÉLECTROPHOTOMÈTRE (blanc non déduit)
0	48
I	56
II	56
IV	56
VI	56

En somme, une légère acidité intensifie légèrement la réaction et un excès notable d'acide sulfurique n'a pas d'influence gênante. Ceci nous a incités à opérer toujours en présence d'un peu d'acide sulfurique en excès par rapport à la quantité nécessaire pour neutraliser la soude. Tous les essais suivants seront donc effectués dans une solution riche en sulfate de sodium et nettement acidifiée par de l'acide sulfurique.

CHOIX D'UN ÉCRAN POUR LE PHOTOMÈTRE. — L'appareil de Meunier (modèle récent) possède 8 écrans. Nous avons affaire à une teinte jaune orangée ; nous avons donc essayé comparativement les écrans n° 43 (violet), n° 47 (bleu), n° 49 (vert bleu), n° 52 (vert) et même, à titre de comparaison, le n° 57 (jaune verdâtre). Voici les lectures effectuées pour chacun de ces écrans avec trois quantités différentes d'ions brome (blanc non déduit) :

	NUMÉRO DES ÉCRANS				
	43	47	49	52	57
200 $\mu\text{g.}$ de Br . . . . .	51	37	24	22	18
500 $\mu\text{g.}$ de Br . . . . .	78	56	35	28,5	19
900 $\mu\text{g.}$ de Br . . . . .	121,5	83	45,5	38	23

L'écran violet n° 43, dont le maximum d'absorption se situe à  $4.300 \text{ \AA}$  est le meilleur.

*Étalonnage* : Pour vérifier la valeur de la méthode et pour tracer une courbe d'étalonnage, nous avons opéré ainsi : pour chaque point de la courbe fut réalisé un mélange de :

- 5 ml. d'une solution saturée en  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  ;
- + 5 ml. d'une solution titrée de BrK ;
- + II gouttes d'acide sulfurique concentré ;
- + 0,5 ml. d'une solution de  $\text{AuCl}_3$  à 0,5 p. 100.

Seuls variaient les titres des solutions de BrK. Les quantités

de Br— ainsi mises en jeu varièrent de 100 à 1.000  $\mu\text{g}$ . Un témoin sans bromure fut préparé et la lecture correspondante à l'électrophotomètre fut soustraite des autres lectures.

Pour chaque quantité de brome, l'expérience fut faite en double. Les deux résultats sont placés côte à côte dans le tableau ci-contre. Ils furent toujours concordants entre 100 et 800  $\mu\text{g}$  de Br.

	QUANTITÉS DE Br EN $\mu\text{g}$ .										
	0	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
Expérience 1. . . . .	0	7,5	15,5	25	33,5	41,5	51,5	61,5	72,5	87,5	97,5
Expérience 2. . . . .	0	8	15	25	32	42	51	61,5	71,5	84	95

Les lectures furent effectuées cinq minutes après l'introduction du chlorure d'or. (Elles furent refaites deux heures après et les résultats furent identiques.)

#### INFLUENCE DES SUBSTANCES ORGANIQUES SUR LA RÉACTION.

Le problème était donc résolu dans le cas d'une simple solution de bromure contenant les substances minérales qui devaient dériver de la minéralisation du brome de nos acides gras bromés ( $\text{SO}_4\text{Na}_2$  et  $\text{SO}_4\text{H}_2$ ). Mais il nous restait à préciser la technique d'élimination des diverses substances organiques qui risquaient d'être gênantes.

Les extraits dans lesquels nous avions à doser le Br contenaient des lipides. Ceux-ci sont saponifiés par l'éthylate de sodium. Les savons qui en dérivent peuvent être facilement éliminés. Pour cela il suffit d'agiter le liquide après acidification avec un peu d'éther. Nous l'avons fait, mais il restait encore dans la phase aqueuse diverses substances dérivant des lipides : 1° du glycérol ; 2° de l'acide phosphorique et des amines provenant de petites quantités de phosphoaminolipides.

Pour savoir si ces substances influaient sur le résultat du dosage de brome, nous avons opéré sur des lipides extraits de sérum sanguin qui furent traités par le sodium et l'alcool comme d'habitude, puis nous avons repris par un peu d'eau et chassé l'alcool par distillation. La solution aqueuse fut refroidie, acidifiée par de l'acide sulfurique, épuisée par de l'éther qui enlevait les acides gras et finalement utilisée pour une série d'essais comparatifs en ajoutant des quantités variables de bromure. Dans les larges limites de nos essais, les résultats du dosage du brome ne furent

jamais influencés par la présence des dérivés hydrosolubles provenant de la saponification des lipides du sérum.

Voici, par exemple, une série de résultats obtenus en dosant les ions  $\text{Br}^-$  en présence des résidus de saponification de lipides sériques en quantités variables. La solution R contenait pour 1 ml. les résidus hydrosolubles provenant de la saponification de 2 mg. de lipides. La quantité de Br était partout la même : 400  $\mu\text{g}$ . Nous opérons à volume constant (10 ml.) en présence de sulfate de sodium en quantité correspondant à celles qui doivent se trouver dans les dosages et en milieu nettement acidulé par  $\text{SO}_4\text{H}_2$ .

	VOLUME DE SOLUTION R (millilitres)				
	1	2	3	4	5
Lectures (blanc déduit) . . .	33	34	33	33	34

D'autre part, une courbe fut tracée pour toutes les quantités de Br variant entre 200 et 600  $\mu\text{g}$  en présence de 2 ml. de solution R. Les points expérimentaux se sont tous rangés sur la droite étalon tracée sans solution R.

Par conséquent, le dosage du Br par notre méthode est possible en présence des dérivés hydrosolubles qui prennent naissance pendant la saponification des lipides dans les conditions où nous devons opérer les dosages.

Notons que la présence d'alcool influe sur les résultats ; aussi est-il nécessaire d'éliminer ce réactif par évaporation.

Enfin, si l'alcool utilisé lors de la minéralisation du Br n'est pas parfaitement pur, une teinte jaune se développe, mais l'épuisement par l'éther l'élimine complètement.

#### TECHNIQUE PROPOSÉE.

RÉACTIFS : Sol. étalon de  $\text{BrK}$  à 200  $\mu\text{g}$  de Br par millilitre (soit 297,5 mg. de  $\text{KBr}$  par litre) ;

Sol. de  $\text{AuCl}_3$  (« chlorure d'or à 50 p. 100 de métal jaune ») ;

Sodium conservé sous pétrole ;

Alcool absolu ;

Solution saturée de  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  ;

Ac. sulfurique concentré ;

Lessive de soude.

L'échantillon à analyser est placé dans un ballon de 50 ml. à col rodé (rodage n° 2) avec 5 ml. d'alcool absolu.



On taille une lame de sodium épaisse de 2 mm. environ dont on découpe un fragment de 1 cm<sup>2</sup> de surface. Ce fragment est immédiatement lavé dans un peu d'éther de pétrole, puis introduit dans le ballon. On adapte aussitôt un réfrigérant ascendant (rodage 2) puis on porte *immédiatement* dans un bain-marie préalablement porté à l'ébullition. On laisse l'ébullition se poursuivre pendant quinze minutes, puis on refroidit.

On transvase dans une ampoule à décanter de 50 ml., en rinçant le ballon à deux reprises par 5 ml. d'eau chaque fois.

On acidifie par de l'acide sulfurique concentré ajouté goutte à goutte jusqu'au virage de la phtaléine. On introduit dans la boule 10 ml. d'éther, on agite puis on laisse décanter. La phase aqueuse est soutirée dans le ballon rodé où s'est faite la saponification ; on la conserve. L'éther resté dans la boule est lavé deux fois par 2 ml. d'eau qui sont soutirés et réunis à la première solution aqueuse. L'éther est éliminé puis on remet les solutions aqueuses dans la boule où on les lave une fois encore de la même façon avec 10 ml. d'éther. Les solutions aqueuses ainsi lavées ont un volume d'une vingtaine de ml. ; on les alcalinise franchement par quelques gouttes de lessive de soude, puis on les concentre par distillation jusqu'à ce que le volume résiduel soit environ 5 ml. Ainsi l'alcool est chassé. Le résidu refroidi est acidifié par de l'acide sulfurique dont on met 11 gouttes en excès par rapport au virage de la phthaléine (comme l'indicateur introduit au début a été extrait par l'éther, il faut en ajouter une nouvelle goutte pour contrôler le virage, mais une seule goutte pour éviter un trouble en milieu acide). On verse la solution dans un tube jaugé à 10 ml., on rince trois fois très soigneusement par 1 ml. d'eau chaque fois et on complète à 10 ml. par de l'eau. On vérifie que le liquide est parfaitement limpide (2).

On ajoute 0,5 ml. de la solution de chlorure d'or et l'on effectue la lecture à l'électrophotomètre après au moins cinq minutes d'attente.

Pour tracer la droite d'étalonnage on réalise trois témoins (chacun vérifiant les deux autres) avec par exemple les mélanges suivants :

*Premier témoin* : 1 ml. de solution étalon de BrK (200 µg de Br)  
+ 5 ml. de solution saturée de SO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>.  
+ 11 gouttes d'acide sulfurique.

Compléter le volume à 10 ml., puis ajouter 0,5 ml. de solution de chlorure d'or.

(2) Sinon on le passe sur un petit filtre en évitant toute évaporation et en prélevant une partie aliquote que l'on diluera à 10 en tenant compte de cette opération lors des calculs.

*Deuxième témoin* : 2,5 ml. de solution étalon de Br (500  $\mu$ g de Br) et mêmes autres réactifs.

*Troisième témoin* : 4 ml. de solution étalon de Br (800  $\mu$ g de Br) et mêmes autres réactifs.

Les lectures sont effectuées avec l'écran n° 43 de l'électrophotomètre de Meunier.

#### QUELQUES CONTRÔLES DE LA MÉTHODE.

1° SUR UN ACIDE GRAS BROMÉ. — Un copieux échantillon d'une solution de dibromo 9-10 stéarate de potassium est analysé par la macrométhode titrimétrique de Charpentier Wolhart qui donne une teneur en brome de 0,73 mg. par millilitre.

Trois petits échantillons (0,5 à 1 ml.) de la même solution sont soumis au microdosage que nous proposons et donnent les résultats suivants : 0,70-0,72-0,71.

2° DE LA  $\gamma$  BROMOPROPYLPHTHALIMIDE PURE est dissoute dans de l'alcool. La solution contient 0,38 mg. de brome par millilitre. Trois dosages effectués par notre méthode sur 1 ml. de la solution donnent les résultats suivants : 0,36-0,38-0,37.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] GUILLAUMIN et MEREJKOWSKY. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1935, **17**, 485-501.
- [2] OLSZYCKA (M<sup>lle</sup> L.). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1935, **17**, 853-870.
- [3] DENIGÈS et CHELLE. *Bull. Soc. Pharm. de Bordeaux*, 1912, **52**, 470-475 ; 1917, **55**, 75-77.
- [4] WALTER. *Zeitschr. gesamte Neurol. und Psychiatrie*, 1919, **47**, 380-390 ; 1925, **95**, 522-539 ; 1925, **97**, 192-208 ; 1925, **99**, 548-551.
- [5] BIELING et WEICHBRODT. *Austauschbeziehungen zwischen Blut und Liquor. Med. Klinik*, 1925.

# ÉTUDES SUR LE COLLAGÈNE

## I. — A PROPOS DES COLLAGÉNASES BACTÉRIENNES

par MARCELLE DELAUNAY, MAYLIS GUILLAUMIE et ALBERT DELAUNAY (\*).

(Institut Pasteur. Annexe de Garches.)

### INTRODUCTION.

Le collagène est une substance particulière qui caractérise, par sa présence, tous les tissus conjonctifs. On l'observe habituellement sous forme de lamelles ou de fibrilles.

Le *mode de production*, la *structure physico-chimique* et le *mode de destruction* de ces fibrilles demeurent assez mal connus. Pour certains, le collagène serait simplement un produit de sécrétion des fibroblastes. Pour d'autres auteurs (Laguesse), la même substance prendrait naissance dans la partie périphérique — ou exoplasme — de ces cellules ; elle aurait donc une origine intracellulaire. Enfin, d'après une troisième théorie, il faudrait voir essentiellement dans le collagène le résultat d'une précipitation albumineuse, celle-ci se produisant d'emblée dans le milieu intercellulaire en étant commandée (Nageotte) ou non (Leriche et Policard) par les éléments cellulaires du tissu conjonctif.

Du point de vue chimique, la substance collagène est constituée surtout par des composés protéiques et glycoprotéiques. Sa structure physique, longtemps obscure, commence seulement à être comprise, grâce à l'emploi du microscope électronique.

Enfin, au sujet des modes de destruction de cette même substance, deux grands mécanismes sont invoqués à l'heure actuelle qui mettent en cause soit des phagocytes : les *macrophages* [1], soit des diastases : les *collagénases*. Nous voudrions envisager spécialement ici le problème des collagénases.

L'existence de ferments capables de détruire spécifiquement le collagène, suggérée déjà par des recherches anciennes de H. Henry [2], semble avoir été démontrée, pour la première fois, en 1937 par un Allemand, E. Maschmann [3], au moyen d'expériences sur de jeunes filtrats de culture de *Welchia perfringens*. C'est à Maschmann que l'on doit le terme de collagénase. Pourtant, l'année suivante [4], cet auteur abandonne sa nouvelle déno-

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 7 octobre 1948.



mination et, en fait, la question reste au point mort jusqu'en 1945.

A cette date, elle est reprise par des histologistes anglais : R. G. Mac Farlane et J. D. Mac Lennan, d'une part [5], et A. H. T. Robb-Smith, d'autre part [6]. Les uns et les autres admettent, dans leurs conclusions, que certaines diastases, élaborées par *Cl. welchii*, peuvent détruire le collagène, alors qu'elles restent sans action sur les fibres musculaires. Ces travaux histologiques réveillent l'attention des chimistes et, dès lors, les recherches sur les collagénases vont se multiplier.

En Amérique, M. W. Jennison [7] découvre le pouvoir collagénasique de quelques microbes aérobies (*Bacillus brevis*, *Bacillus mycoides* et *Bacillus mesentericus*) et de plusieurs anaérobies (*Clostridium histolyticum*, *Clostridium lentoputrescens*, *Clostridium sporogenes* et *Clostridium bifermentans*). Il règle les conditions d'examen *in vitro* et signale les rapports qui paraissent exister entre la constitution du milieu de culture et l'activité collagénasique des filtrats. Dans une note récente [8], il étudie plus spécialement le pouvoir collagénasique des filtrats de *Cl. histolyticum*.

En Angleterre, dans le même domaine, il faut signaler les recherches particulièrement remarquables de C. L. Oakley, G. H. Warrack et W. E. Van Heyningen [9], et de E. Bidwell et W. E. Van Heyningen [10]. Ces différents auteurs ont décelé la présence, dans les filtrats de *Cl. welchii* type A, d'une diastase particulière qui est une collagénase et qu'ils ont appelée toxine  $\alpha$ , pour mieux la distinguer de la toxine  $\alpha$  (lécithinase), de l'hémolytine oxydable H et de l'hyaluronidase également présente dans ces filtrats. Ils ont établi diverses méthodes pour titrer *in vitro* la valeur collagénasique de leurs milieux. Ils ont examiné le pouvoir anticollagénasique de différents sérums. Enfin, en 1948, dans leur dernière communication [10], ils annoncent qu'ils sont parvenus à obtenir une collagénase purifiée dont P. A. Charlowood a déterminé, au moins partiellement, les propriétés électrophorétiques [11].

Pour diverses raisons, que nous exposerons à la fin de cette note, il nous a paru intéressant d'aborder à notre tour l'étude des collagénases bactériennes.

## PARTIE EXPÉRIMENTALE.

Le premier problème qui, selon nous, méritait d'être envisagé, était la mise au point d'une méthode capable de faciliter la recherche des collagénases dans les préparations soumises à l'examen. Sans doute, celles qu'utilisent les Américains et les Anglais [méthode par pesée (Jennison), méthode de l'Azocoll (Oakley), etc.], rendent déjà de grands services. Néanmoins, de

l'avis même de leurs auteurs, elles sont d'un emploi assez délicat.

Après divers tâtonnements, nous avons adopté le procédé suivant :

1. MÉTHODE PERSONNELLE DE TITRAGE. — Nous avons choisi, comme substrat, le collagène purifié selon la technique de J. Nageotte et L. Guyon [12], que ces derniers désignent sous le nom de collagène A.

On retire les tendons de la queue de rats et on les place dans une solution d'acide acétique au 1/10.000. Ils sont laissés dans ce milieu, à la glacière, pendant vingt-quatre heures en présence de toluène. A ce moment, la préparation est constituée par l'eau acétifiée qui renferme, en suspension, des débris de tendon gonflés et, en solution, du collagène. On élimine les débris par filtration et on ajoute au filtrat un volume égal d'une solution de  $\text{ClNa}$  à 2,5 p. 100. Le collagène dissous commence à précipiter aussitôt. Cette précipitation sera presque complète au bout de quelques heures. On fait alors une seconde filtration, cette fois sur une membrane de collodion. Le collagène précipité se dépose sur la membrane de manière assez homogène, en donnant une pellicule mince. Celle-ci, après dessiccation convenable, est détachée du collodion ; elle ressemble alors à une feuille de papier à cigarettes. Dans cette pellicule, sont régulièrement découpées, avec emporte-pièce, de petites pastilles formées de collagène solidifié, semi-transparent, pur. Ces pastilles sont conservées et stérilisées dans l'éther. Elles serviront, au fur et à mesure des besoins, après avoir été lavées dans de l'eau physiologique, pour rechercher la présence de collagénases dans les différents milieux qu'on désire examiner. En présence d'une collagénase, les pastilles de collagène A subissent un processus de lyse progressive qui peut amener leur disparition complète. Si le milieu est riche en ferment, cette destruction est particulièrement rapide.

Nous avons employé régulièrement, pendant plusieurs mois, cette méthode de titrage. Nous pouvons lui reconnaître les avantages suivants :

a) Elle est *fidèle*. Etant donné qu'on met en œuvre un collagène très pur, la rapidité et l'intensité de la destruction des pastilles sont seulement fonction de la richesse du milieu en diastase. Le phénomène observé est bien spécifique.

b) Elle donne des *résultats très commodes à lire*, compte tenu de la régularité et du faible volume des pastilles.

c) Enfin, elle n'offre, dans son emploi, *aucune difficulté*, la préparation du collagène A ne réclamant qu'un léger entraînement.

2. PRÉSENCE DE COLLAGÉNASES DANS DIFFÉRENTS MILIEUX. — A l'aide de la méthode de titrage que nous venons d'exposer, nous

avons recherché la présence d'une collagénase dans des filtrats de *Welchia perfringens*, dans quelques autres toxines microbiennes dermo-nécrosantes, et dans des solutions de venin de vipère (*Vipera aspis*). Nous donnerons ici brièvement nos résultats.

*A. Recherche de la collagénase dans différents filtrats de culture de Welchia perfringens.* — Ces filtrats provenaient de cultures du germe en bouillon VF., glucosé à 1 p. 1.000 et additionné de 1,5 p. 1.000 de sang desséché. La soucheensemencée était âgée de vingt-quatre heures et la durée de séjour des cultures à l'étuve (30 à 32°) de quatorze heures. La filtration était opérée sur bougie L3.

Sept filtrats ont été étudiés qui différaient par la nature de la soucheensemencée (souche S. S., souche Moyen, souche Lechien), par leur pouvoir toxique (le nombre de doses mortelles pour des souris blanches de 17 à 20 g., injectées par voie intraveineuse, variait, pour 1 cm<sup>3</sup>, entre 4 et 60), par leur richesse en lécithinase, la dose minima lécithinasique du filtrat le plus actif étant égale à 0,002 cm<sup>3</sup> (il s'agit du volume de toxine qui est capable, en présence de calcium, de provoquer une opalescence légère, mais nette, dans 0,2 cm<sup>3</sup> de sérum humain).

Ces divers filtrats ont été utilisés purs ou dilués dans l'eau physiologique, au 1/5, au 1/10, au 1/50, au 1/100, au 1/500, au 1/1.000 et au 1/2.000. A chacune de ces préparations réparties stérilement en tubes, sous le volume de 4 cm<sup>3</sup>, nous avons ajouté une ou deux pastilles de collagène, puis nous les avons déposées à l'étuve à 38° en surveillant attentivement l'état du collagène. Nous avons fait alors les constatations suivantes :

*Nos filtrats, sans exception, se sont montrés capables de lyser les pastilles de collagène.* Ils renfermaient donc tous une collagénase. Ainsi, pouvons-nous confirmer tout à fait les travaux des auteurs anglais [9-10] sur la présence effective de ce ferment dans les filtrats de culture de *Cl. welchii* (fait intéressant à signaler puisque M. W. Jennison rapporte [7] n'avoir obtenu que des résultats négatifs avec ses préparations de toxine *perfringens* filtrées). Toutefois, à en juger par la rapidité et l'intensité de la destruction du collagène A, il faut reconnaître que nos résultats ont été assez variables.

a) Un filtrat (celui qui provenait du milieu de culture de la souche Lechien) a été particulièrement actif. Les petits fragments de collagène, déposés dans ce filtrat pur ou dilué au 1/10, ont disparu en une heure trente. Dans le filtrat dilué cent fois, cette destruction s'est opérée en moins de vingt-quatre heures. Cinq jours ont été nécessaires pour que la lyse du collagène soit complète dans le filtrat dilué cinq cents fois. Avec les filtrats dilués au 1/1.000 et au 1/2.000, la destruction des pastilles n'a jamais



été que partielle. Ces résultats sont schématiquement reproduits dans le tableau ci-dessous.

**Pouvoir collagénasique d'un filtrat de culture  
de *Welchia perfringens*.  
(souche Lechien).**

QUANTITÉ de filtrat employé	IMPORTANCE DE LA DESTRUCTION DU COLLAGÈNE (++++ : lyse complète) au bout de			
	2 heures	24 heures	48 heures	5 jours
Filtrat pur . . . . .	++++			
Filtrat dilué au 1/10. . .	++++			
Filtrat dilué au 1/100. . .	++++±	++++		
Filtrat dilué au 1/500 . .	++	+++±	+++±	++++
Filtrat dilué au 1/1.000 .	+	+++	+++±	+++
Filtrat dilué au 1/2.000 .	0	+	+	+

b) Cinq filtrats, provenant tous de la souche S. S., ont manifesté des pouvoirs collagénasiques à peu près comparables (lyse totale des pastilles de collagène en vingt-quatre heures avec les filtrats purs ou dilués au 1/10 ; lyse totale en quarante-huit heures avec la dilution au 1/100 ; lyse seulement partielle ou nulle avec les dilutions supérieures au bout de cinq jours).

c) Un filtrat enfin (souche Moyen) a été très peu actif. Il a fallu quatre à sept jours pour que le collagène soit complètement détruit dans les filtrats purs ou dilués au 1/10. Aucune destruction avec les dilutions supérieures.

Nous avons recherché s'il y avait un rapport entre la teneur de nos filtrats en lécithinase et leur teneur en collagénase. Il ne semble pas. En effet, si le filtrat provenant de la souche Moyen, qui renfermait très peu de collagénase, était aussi très pauvre en lécithinase, le filtrat Lechien, très riche en collagénase, avait un plus faible pouvoir lécithinasique que les filtrats S. S. d'activité collagénasique moyenne.

Nous avons étudié, d'autre part, l'influence du vieillissement, du chauffage et du formol sur le pouvoir collagénasique de nos filtrats. Nous avons essayé en outre de neutraliser ce pouvoir au moyen de l'anticorps spécifique. Nous résumerons ainsi nos nouvelles observations.

Le vieillissement ne paraît pas altérer de façon notable le pouvoir collagénasique des filtrats de *Welchia perfringens*. Du moins, il en a été ainsi avec les filtrats que nous avons examinés, mais sans doute, faut-il tenir compte ici de la nature du milieu. Ce pouvoir restait élevé dans des préparations conservées depuis un mois en glacière à la température de 4°.

La collagénase de *Welchia perfringens* est sensible à la chaleur (observation déjà faite par Bidwell et Van Heyningen). Des filtrats chauffés à 100° pendant trente minutes n'ont plus d'activité collagénasique.

L'addition de formol aux filtrats (5 p. 1.000 de formol) atténue l'activité collagénasique. Les filtrats formolés examinés après cinq jours d'étuve à 37° font disparaître le collagène plus tardivement et plus irrégulièrement que les mêmes filtrats non formolés.

Enfin, à propos de l'action neutralisante de l'immunsérum spécifique, nos résultats ont été également nets. Nous avons mélangé, à parties égales (2 cm<sup>3</sup>), des filtrats de *Welchia perfringens* (souche S. S.) et des dilutions plus ou moins poussées d'un sérum anti-*perfringens* titrant 300 unités anti- $\alpha$  et 2.000 unités anti- $\beta$ . Dans ces divers mélanges, nous avons introduit, selon notre technique habituelle, des pastilles de collagène. Vingt-quatre heures plus tard, ces pastilles étaient totalement détruites dans les tubes contenant les dilutions de sérum au 1/2.000 et au 1/1.000 ; elles n'avaient que partiellement disparu dans les dilutions au 1/200 ; elles étaient intactes dans les tubes renfermant des dilutions de sérum au 1/100 et au 1/20.

B. *Etude de l'activité collagénasique de diverses toxines dermo-nécrosantes et du venin de Vipera aspis.* — Notre examen a porté sur 2 échantillons de filtrats de culture du bacille diphtérique, 5 échantillons de filtrats staphylococciques, plusieurs préparations d'endotoxine typhique. Cette fois, tous nos résultats ont été négatifs. Aucun de ces produits ne s'est montré capable de lyser le collagène *in vitro*. Leur pouvoir dermo-nécrosant ne résulte donc pas, *in vivo*, d'une atteinte élective de cette substance. La toxine tétanique, qui n'est pas nécrosante *in vivo*, n'a pas non plus d'activité collagénasique *in vitro*. Pour toutes ces expériences, nous opérons dans un milieu ajusté à un pH physiologique.

Le venin de *Vipera aspis*, qui possède un pouvoir dermo-nécrotique si prononcé, n'exerce cependant qu'une faible action collagénasique *in vitro*. Des solutions de ce venin en eau physiologique, renfermant 10 milligrammes par centimètre cube, attaquent à peine le collagène A. Seules, des concentrations très fortes (par exemple 50 milligrammes de venin par centimètre cube) parviennent parfois à le détruire.

#### DISCUSSION.

La découverte récente des collagénases mérite, à notre avis, d'intéresser à la fois les microbiologistes et les anatomo-pathologistes.

En microbiologie, elle a déjà permis de compléter — au moins momentanément — l'inventaire des différents principes actifs que renferment les filtrats de culture de *Welchia perfringens* ; comme nous l'avons indiqué, l'activité collagénasique de ces filtrats est remarquable. Toutefois, *Welchia perfringens* n'est certainement pas le seul germe capable d'élaborer une collagénase. M. W. Jenkinson [7] a déjà montré que cette diastase pouvait aussi être produite par des aérobies : *Bacillus brevis*, *mycoides*, *mesentericus*, et des anaérobies autres que *Cl. perfringens*, comme *Cl. histolyticum*, *lentoputrescens*, *sporogenes*, etc... Sans doute, cette liste n'est pas close. Aux microbiologistes incombera la tâche de la continuer. Il importera surtout, dans cette direction, de préparer des milieux de culture favorables à la production du ferment, de régler le temps de culture, etc.

En ce qui concerne plus particulièrement la collagénase de *Welchia perfringens*, on s'est demandé si cette diastase prenait une part active au développement du tableau clinique de la gangrène gazeuse. Les premiers auteurs qui ont envisagé la question (Maschinann, Mac Farlane et Mac Lennan, Robb-Smith) ont répondu affirmativement. Plus récemment, D. G. Evans [13] s'est montré moins catégorique. Cet auteur, en effet, a constaté que les immunosérums riches en anticollagénase ne protègent pas mieux les cobayes infectés par *Cl. welchii* que les sérums pauvres à cet égard. Il a donc admis que la gravité générale de l'infection, en ce cas, était surtout sous la dépendance de la toxine  $\alpha$ , que l'action de la collagénase bactérienne était simplement locale et limitée à la destruction de l'enveloppe conjonctive des faisceaux musculaires. En présence de ces avis différents, il faut souhaiter que de nouvelles recherches soient entreprises. Leurs résultats permettront de régler dans les meilleures conditions la préparation d'immunosérums puissants.

En pathologie, la découverte des collagénases n'a pas moins de signification. L'importance du collagène, comme constituant de la trame conjonctive est fondamentale. C'est par suite de l'élaboration de cette substance que les plaies se ferment peu à peu : le tissu cicatriciel est surtout formé de collagène. Mais à côté de ce rôle utile, on doit signaler aussi l'existence de toutes ces maladies chroniques qui s'accompagnent d'une production excessive et désordonnée, localisée ou généralisée, de collagène au détriment des cellules nobles ou actives de l'organisme. On se trouve alors en présence de processus scléreux (artériosclérose, cirrhoses du foie, de la rate, etc.) capables de troubler gravement la vie des tissus. Pour empêcher ou pour résorber ces réactions scléreuses, aucune méthode efficace n'a encore été trouvée. Pourra-t-on faire usage à l'avenir de collagénases ? La question mérite d'être résolue.



Personnellement, c'est surtout comme anatomo-pathologistes que nous avons l'intention de poursuivre l'étude des collagénases. Notre plan de travail est simple : obtenir des préparations purifiées de ferments ou du moins des préparations non toxiques ; les injecter dans des foyers localisés de sclérose ou chez des sujets atteints de sclérose diffuse ; observer enfin leur action.

## RÉSUMÉ.

1° Les auteurs, après avoir rappelé les travaux récents sur les collagénases, ou ferments capables de détruire le collagène, ont indiqué une méthode particulièrement simple pour déceler la présence de ces diastases.

2° Ils ont confirmé les travaux de Maschmann et des auteurs anglais en constatant la présence effective d'une collagénase dans les filtrats de culture de *Welchia perfringens*. Ils ont étudié les variations de l'activité collagénasique de ces filtrats sous l'action du vieillissement, du formol, de la chaleur et du sérum anti-*perfringens*.

3° Enfin, dans leurs conclusions, les auteurs ont souligné l'importance des collagénases en microbiologie et en pathologie.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] *Arch. Path.*, 1940, **30**, 868.
- [2] *J. Path. a. Bact.*, 1923, **26**, 497.
- [3] *Biochem. Z.*, 1937, **295**, 1 ; *ibid.*, 1938, **295**, 351 ; *ibid.*, 1938, **297**, 284.
- [4] *Biochem. Z.*, 1938, **300**, 89.
- [5] *Lancet*, 1945, **249**, 328.
- [6] *Ibid.*, 1945, **249**, 362.
- [7] *J. Bact.*, 1945, **50**, 369.
- [8] *Ibid.*, 1947, **54**, 55.
- [9] *J. Path. a. Bact.*, 1946, **58**, 229.
- [10] *Biochem. J.*, 1948, **42**, 140.
- [11] *Biochem. J.*, 1948, **42**, 150.
- [12] *Arch. Biol.*, 1930, **41**, 1.
- [13] *Lancet*, 1945, **249**, 478 ; *Brit. J. exp. Path.*, 1947, **28**, 24.

## RECHERCHES SUR LES TOXINES DU B. D'EBERTH ET DU B. PARATYPHIQUE B.

par S. MUTERMILCH.

(Hôpital Henri-Rousselle et Laboratoires P. BEYTOUT.)

Les fièvres typhoïdes et paratyphoïdes sont des maladies toxiques ; c'est au moins l'opinion de nombreux expérimentateurs et cliniciens, opinion appuyée particulièrement par les belles recherches de H. Vincent sur l'entérotoxine et la neurotoxine typhiques.

Dès lors on pouvait se demander s'il n'aurait pas été avantageux d'appliquer au traitement et à la vaccination dans ce groupe d'infections, les mêmes méthodes qui ont si brillamment réussi dans la diphtérie, le tétanos et diverses autres maladies essentiellement toxiques, grâce aux travaux classiques de pionniers tels que Roux, Ramon et autres.

Cette idée avait incité plusieurs auteurs à tenter la préparation des vaccins et des sérums anti-typho-paratyphoïdiques, au moyen d'une *endotoxine* microbienne. Ainsi, Grasset et Gory [1] ont, dès 1927, publié les résultats de leurs recherches sur l'endotoxine typhique obtenue par des congélations et des décongélations successives des émulsions bacillaires. Dans une série de publications ultérieures, Grasset et ses collaborateurs [2] ont confirmé les propriétés vaccinales de cette endotoxine et l'action curative des sérums anti-endotoxiques.

De leur côté, Reilly, Rivalier et Stéfanescu [3] ont essayé un sérum anti-paratyphique B vis-à-vis de l'endotoxine préparée selon le procédé de Besredka.

En ce qui concerne l'exotoxine du bacille d'Eberth, H. Vincent a montré l'extrême sensibilité des animaux vis-à-vis de la neurotoxine, mais la préparation de celle-ci est, malheureusement, des plus délicates. Le lapin, d'autre part, se montre sensible vis-à-vis de l'injection intraveineuse des filtrats de cultures du bacille d'Eberth en bouillon : 1 cm<sup>3</sup> de filtrat d'une culture âgée de cinq jours détermine, en effet, chez cet animal, de la somnolence, de la prostration générale et, souvent, la mort qui survient quelques heures après l'inoculation. Ce phénomène a été récemment décrit par nous-même [4] et par M. Raynaud [5]. Toutefois, les symptômes d'intoxication typhique chez le lapin ne sont pas

suffisamment nets, et la mort, chez les animaux inoculés, ne survient pas avec assez de régularité pour qu'on puisse se servir de cette technique pour le titrage de la toxine.

Nous avons ainsi été amené à proposer la recherche du *test leucocytaire* pour la mise en évidence et le dosage de la toxine typhique.

Les leucocytes se montrent, en effet, très sensibles vis-à-vis des toxines de divers bacilles du groupe entérique. Ainsi, dès 1937, nous avons constaté, en collaboration avec Agasse-Lafont et Grimberg, que les filtrats des cultures sur bouillon du colibacille contenaient une leucocidine thermostable vis-à-vis des leucocytes du lapin. Les résultats de ces recherches sont restés inédits pour des raisons indépendantes de notre volonté.

De leur côté, Robertson et Yu [6] (1938) d'une part, et Dennis et Senekjian [7] (1939) d'autre part, ont signalé que les filtrats typhiques déterminaient une forte leucopénie chez des lapins inoculés par la voie intraveineuse. Toutefois, ces auteurs n'ont pas été d'accord sur l'action leucolytique de ces filtrats *in vitro* : niée par les deux premiers, elle est admise par les deux derniers de ces auteurs.

Enfin, les travaux de Morgan [8] (1940-1941) signalent l'action leucolytique des extraits des bacilles typhiques, et ceux de Delaunay [9] la leucopénie que provoque chez le cobaye l'injection de l'antigène glucido-lipidique du bacille d'Eberth.

Nous avons repris l'étude de l'action anti-leucocytaire des filtrats des cultures en bouillon de bacille d'Eberth en 1946, mû par l'idée que ce phénomène pourrait servir de base à la mise en évidence et au titrage des toxines typhique et paratyphique. Nous avons montré, dans une de nos premières notes sur cette question, qu'en injectant dans la veine marginale de l'oreille de lapin des quantités, même très faibles, de filtrats de cultures en bouillon du bacille d'Eberth, on constate une chute rapide du nombre total des leucocytes et une diminution notable du nombre des leucocytes polynucléaires pouvant, dans certains cas, aller jusqu'à leur disparition complète. Cette action anti-leucocytaire se produit presque immédiatement après l'injection du filtrat ; elle se prolonge au cours de plusieurs heures consécutives à l'inoculation, et elle est suivie d'une phase d'hyperleucocytose compensatrice souvent considérable.

Voici, à titre d'exemple, une de ces expériences :

#### EXPÉRIENCE.

Le filtrat d'une culture de bacille d'Eberth en bouillon, âgée de cinq jours, est injecté dans la veine du lapin à la dose de 1 cm<sup>3</sup>.



*Examen hématologique.*

	AVANT l'injection	APRÈS				
		30	90	5	24	48
		minutes	minutes	heures	heures	heures
Nombre total des leucocytes.	6.400	2.100	2.600	3.200	6.000	13.200
Polynucléaires (p. 100) . . .	46	4	4	60	74	50
Mononucléaires (p. 100) . . .	54	96	96	40	26	50

Nous avons aussi démontré que la leucolyse, constatée *in vivo*, peut être réalisée *in vitro*.

Voici, à titre d'exemple, une de ces expériences :

## EXPÉRIENCE.

On injecte dans la plèvre d'un lapin 5 cm<sup>3</sup> d'une émulsion stérile à 10 p. 100 de farine dans l'eau physiologique. Le lendemain, à l'aide d'une pipette Pasteur effilée, on ponctionne la plèvre et on aspire l'exsudat contenant un grand nombre de globules blancs. On laisse tomber 1 goutte de cet exsudat dans un tube stérile contenant 0,5 cm<sup>3</sup> du filtrat typhique. On met le tube à l'étuve à 37° et à des intervalles variables on prélève, à l'aide de pipettes stériles, des gouttelettes du mélange qu'on examine au microscope : 1° A l'état frais entre lame, et lamelle ; 2° sur des frottis colorés au bleu de méthylène.

Cette expérience a montré que les leucocytes de lapin, suspendus dans le liquide toxique, commencent à s'arrondir et à subir la lyse trente à quarante minutes après ; cette lyse s'accroît au cours du séjour plus prolongé à l'étuve, et elle devient quasi complète six heures après. On constate, en même temps, une coloration intense en bleu de leurs noyaux. Bien entendu, les tubes témoins contenant des leucocytes suspendus dans du bouillon stérile ont montré une conservation parfaite des leucocytes avec leurs prolongements amiboïdes du protoplasme et leur colorabilité normale.

Nos nouvelles recherches concernent la *toxine du bacille paratyphique B*, laquelle est douée du même pouvoir leucocytaire que la toxine typhique, mais, à l'encontre de cette dernière, elle ne détermine pas, du moins avec les souches dont nous nous sommes servis, la mort des animaux.

Voici, à titre d'exemple, une de ces expériences :

## EXPÉRIENCE.

On injecte dans les veines de trois lapins les quantités suivantes d'un filtrat de culture en bouillon du B. paratyphique B, âgé de cinq jours : 1 cm<sup>3</sup>, 1 cm<sup>3</sup> d'une dilution au 1/10 et 1 cm<sup>3</sup> d'une dilution au 1/100. Les examens hématologiques sont pratiqués à des intervalles variant de trente minutes à vingt-quatre heures.

*Examen hématologique.*

LAPIN	TOIXNE		AVANT l'injection	APRÈS			
				30 minutes	90 minutes	5 heures	24 heures
94	1 cm <sup>3</sup> pur.	Nombre total des leucocytes. . . . .	9.400	5.200	3.600	2.000	34.200
		Polynucléaires (p. 100) . .	26	20	1	18	78
		Mononucléaires (p. 100) . .	74	80	99	82	22
95	1 cm <sup>3</sup> au 1/10.	Nombre total des leucocytes. . . . .	18.700	8.000	7.000	10.400	27.000
		Polynucléaires (p. 100) . .	42	10	0	40	70
		Mononucléaires (p. 100) . .	58	90	100	60	30
97	1 cm <sup>3</sup> au 1/100.	Nombre total des leucocytes. . . . .	13.600	21.000	9.000	9.000	16.800
		Polynucléaires (p. 100) . .	41	37	15	69	62
		Mononucléaires (p. 100) . .	59	43	85	31	38

Par conséquent, la toxine du B. paratyphique B exerce un pouvoir lytique considérable vis-à-vis des leucocytes polynucléaires du lapin aux doses de 1 cm<sup>3</sup> pur et au 1/10, et un pouvoir lytique faible à la dose de 1 cm<sup>3</sup> dilué au 1/100.

ACTION COMBINÉE DU FORMOL ET DE LA CHALEUR SUR LES TOXINES DU B. D'EBERTH ET DU B. PARATYPHIQUE B. — Dès l'instant où nous avons constaté que le test leucocytaire reflétait la toxicité des filtrats microbiens, nous avons cru intéressant de tenter leur transformation en produits atoxiques, grâce à l'action combinée du formol et de la chaleur. Ainsi qu'il ressort d'une note que nous avons présentée à la séance du 14 juin 1947 à la Société de Biologie, cette transformation est parfaitement réalisable en ce qui concerne la toxine du B. d'Eberth. Nous avons, en effet,

montré qu'en ajoutant à cette toxine 3 à 5 p. 1.000 de formol, et en maintenant cette action pendant vingt à trente jours à la température de 37°, on transformait la toxine en un produit dépourvu de toute action mortelle et leucolytique pour le lapin.

La même technique appliquée à la toxine du *B. paratyphique B* nous a fourni les mêmes résultats favorables. En effet, en ajoutant à un filtrat d'une culture de *B. paratyphique B* en bouillon, âgée de cinq jours, 5 p. 1.000 de formol, on obtient, après un séjour de vingt à trente jours à l'étuve, un produit dépourvu de tout pouvoir leucolytique pour le lapin, ainsi qu'il ressort de l'expérience ci-dessous.

### Expérience.

LAPIN	TOXINE 1 cm <sup>2</sup>		AVANT l'injection	APRÈS			
				30 minutes	30 minutes	5 heures	24 heures
94	Non formolée.	Nombre total des leucocytes.	9.100	17.000	3.600	2 000	34.000
		Polynucléaires (p. 100).	26	20	1	18	78
		Mononucléaires (p. 100).	74	80	99	82	22
95	Formolée.	Nombre total des leucocytes.	28.000	15.000	13.000	16.400	43.000
		Polynucléaires (p. 100).	52	44	55	88	55
		Mononucléaires (p. 100).	48	56	45	12	45

### VACCINATION DES ANIMAUX.

A. TOXINE TYPHIQUE. — Voici le résumé de nos expériences sur la vaccination des lapins, tel qu'il résulte de nos deux publications antérieures :

1. Les lapins vaccinés avec le filtrat typhique, formolé ou non formolé, ne présentent aucun symptôme habituel d'intoxication lorsqu'ils sont inoculés par la voie intraveineuse avec des doses de toxine et de cultures vivantes, toxiques ou mortelles pour les lapins non vaccinés.

2. Les lapins vaccinés avec la toxine non formolée développent, dans leurs sérums, des quantités appréciables d'agglutinines et de précipitines spécifiques.

3. Les lapins vaccinés avec la toxine typhique formolée à 5 p. 1.000 développent, dans leurs sérums, de fortes quantités



d'agglutinines anti-O ; la présence des précipitines spécifiques a été constatée chez la moitié des lapins vaccinés.

B. TOXINE PARATYPHIQUE B. — I. *Expériences sur des lapins.* — Quatre lapins n<sup>os</sup> 93, 94, 95 et 100 reçoivent sous la peau, tous les huit jours, les doses suivantes de toxine paratyphique B (1) formolée à 5 p. 1.000 : 0,5 cm<sup>3</sup> ; 1 cm<sup>3</sup> ; 1,5 cm<sup>3</sup> ; 2 cm<sup>3</sup>.

Les lapins sont saignés partiellement huit jours après la dernière injection vaccinnante, et leurs sérums décantés et inactivés.

On procède ensuite à la recherche dans ces sérums des agglutinines et des précipitines spécifiques et à l'épreuve de résistance de ces animaux vis-à-vis des injections intraveineuses de la toxine correspondante.

### Réaction d'agglutination.

DILUTION du sérum	ANTIGÈNE O				ANTIGÈNE H			
	93	94	95	100	93	94	95	100
1 : 100	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
1 : 200	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
1 : 400	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
1 : 800	++++	++++	+++	+++	++++	++++	++++	++++
1 : 1.600	+	++++	±	±	++++	++++	++	++++
1 : 3.200	0	±	0	0	++	+++	0	++

Par conséquent, les sérums des lapins vaccinés avec la toxine paratyphique B formolée agglutinent les antigènes O et H correspondants aux taux de 1 : 2.000 à 1 : 3.000 environ. Les sérums des mêmes lapins, éprouvés avant la vaccination, n'ont pas donné d'agglutination au taux de 1 : 100.

### Réaction de précipitation.

I. — *Vis-à-vis de la toxine paratyphique B non formolée.* — On mélange, dans une série de tubes à hémolyse, des doses fixes du filtrat paratyphique B avec des doses variables des sérums des lapins vaccinés. Les tubes sont laissés pendant quatre à six heures à l'étuve et jusqu'au lendemain à la température du laboratoire.

(1) La souche du B. paratyphique B qui nous a servi dans ces expériences est la souche 350, mise aimablement à notre disposition par M. Le Minor, de l'Institut Pasteur ; sa virulence a été, en outre, renforcée par trois passages successifs sur cobaye.

*Résultat.*

TOXINE paratyphique B	SÉRUM des lapins vaccinés	LAPIN			
		93	94	95	100
1 cm <sup>3</sup> .	1 cm <sup>3</sup> .	++++	+++	+++	++++
1 cm <sup>3</sup> .	0,5 cm <sup>3</sup> .	++++	+	+	++++
1 cm <sup>3</sup> .	0,2 cm <sup>3</sup> .	++	0	0	+++

II. *Vis-à-vis de la toxine paratyphique B formolée.* — Même technique que ci-dessus.

*Résultat.*

TOXINE paratyphique B formolée	SÉRUM de lapin vacciné	LAPIN			
		93	94	95	100
1 cm <sup>3</sup> .	1 cm <sup>3</sup> .	+++	++++	++++	+++
1 cm <sup>3</sup> .	0,5 cm <sup>3</sup> .	+	++	++	+
1 cm <sup>3</sup> .	0,2 cm <sup>3</sup> .	0	±	±	0

Par conséquent, les sérums des lapins vaccinés avec les filtrats formolés des cultures du B. paratyphique B flocculent la toxine correspondante, qu'elle soit formolée ou non formolée.

*Résistance des lapins vaccinés vis-à-vis des injections intraveineuses de la toxine paratyphique B.*

Deux lapins vaccinés, ainsi qu'un lapin témoin, reçoivent dans les veines 1 cm<sup>3</sup> du filtrat paratyphique B.

Par conséquent, les lapins vaccinés avec la toxine du B. paratyphique B formolée, à l'encontre du lapin non vacciné, ne subissent pas de lyse de leurs leucocytes polynucléaires, ou bien cette lyse n'est qu'insignifiante, lorsqu'on leur injecte dans les veines la toxine active. Ils montrent, au contraire, une hyperleucocytose pouvant s'expliquer par une vive réaction de défense d'un organisme réfractaire.

*Examen hématologique.*

LAPIN		AVANT l'injection	APRÈS			
			30 minutes	90 minutes	5 heures	24 heures
93 vacciné.	Nombre total des leucocytes.	6.700	5.600	6.400	18.000	21.000
	Polynucléaires (p. 100) .	44	29	56	82	70
	Mononucléaires (p. 100).	56	71	44	18	30
100 vacciné.	Nombre total des leucocytes.	4.400	8.000	4.600	5.200	25.000
	Polynucléaires (p. 100) .	22	20	16	73	69
	Mononucléaires (p. 100).	78	80	84	27	31
Témoin non vacciné.	Nombre total des leucocytes.	8.000	4.000	1.500	20.200	10.400
	Polynucléaires (p. 100) .	34	20	5	83	43
	Mononucléaires (p. 100.)	66	80	95	17	57

II. *Expérience sur cobayes.* — La souche du B. paratyphique B, dont la virulence a été renforcée par trois passages successifs dans le péritoine du cobaye, tuait le cobaye par injection intrapéritonéale à la dose de 25 millions de germes environ en vingt-quatre heures.

Dix cobayes ont été vaccinés par quatre injections sous-cutanées successives de la toxine paratyphique B formolée. Les doses du vaccin furent les suivantes : 0,5 cm<sup>3</sup> ; 1 cm<sup>3</sup> ; 1,5 cm<sup>3</sup> ; 2 cm<sup>3</sup>.

Huit jours après la dernière injection vaccinante, on éprouve quatre de ces cobayes, ainsi que quatre autres cobayes non vacci-

*Résultat.*

COBAYE	DOSE INJECTÉE	
Vacciné . . . . .	300 millions..	Survit.
Vacciné . . . . .	150 —	Survit.
Vacciné . . . . .	75 —	Survit.
Vacciné . . . . .	37,5 —	Survit.
Témoin . . . . .	300 millions.	Succombe en 24 heures.
Témoin . . . . .	150 —	Succombe en 24 heures.
Témoin . . . . .	75 —	Succombe en 24 heures.
Témoin . . . . .	37,5 —	Succombe en 24 heures.



nés servant de témoins avec des doses variables des bacilles vivants par injections intra-péritonéales.

*Par conséquent*, les cobayes vaccinés avec la toxine du B. paratyphique B formolée résistent aux doses au moins douze fois mortelles pour les cobayes non vaccinés.

*Séro-protection.* — Dans cette expérience, trois cobayes neufs ont été inoculés préventivement dans le péritoine avec des doses variables d'un mélange des sérums des lapins vaccinés avec la toxine paratyphique B formolée. Trente minutes après, on leur injecte dans le péritoine, ainsi qu'à deux cobayes témoins, 150 millions de bacilles vivants, c'est-à-dire six doses mortelles environ.

### Résultat.

COBAYE	SÉRUM de lapins vaccinés	BACILLES VIVANTS	
1 . . . . .	1,5 cm <sup>3</sup> .	150 millions.	Survit.
2 . . . . .	1,0 cm <sup>3</sup> .	150 —	Survit.
3 . . . . .	0,5 cm <sup>3</sup> .	150 —	Survit.
Témoins } 4. . .		150 millions.	Succombe en 24 heures.
} 5. . .		150 —	Succombe en 24 heures.

*Par conséquent*, l'injection préventive d'un sérum anti-toxique de lapin, pratiquée trente minutes avant l'injection intrapéritonéale des six doses mortelles de bacilles vivants, protège ces animaux contre l'infection et la mort.

*Discussion.* — Le principe leucolytique contenu dans les filtrats des cultures en bouillon des bacilles typho-paratyphoïdiques, est-il une exo- ou une endotoxine ?

Une nouvelle série de recherches serait nécessaire pour répondre à cette question. Quoi qu'il en soit, les deux arguments suivants plaident en faveur de l'hypothèse qu'il s'agit ici d'une exotoxine :

1° Le principe leucolytique apparaît dans les cultures en bouillon déjà vers la sixième heure après l'ensemencement ; son taux est, à ce moment, peu élevé, mais il augmente progressivement au cours des jours suivants pour atteindre son maximum vers le quatrième-cinquième jour où les cultures deviennent abondantes. Ce taux est facile à préciser, soit au moyen d'inoculations aux lapins, soit au moyen d'une flocculation par des sérums des lapins préparés.

2° Le principe leucolytique typho-paratyphoïdique, tout comme les toxines : diphtérique, tétanique, et autres, se transforme

facilement, sous l'action du formol et de la chaleur, en produit atoxique dont le pouvoir antigène reste intact.

Le même principe leucolytique que nous avons mis en évidence chez le lapin, inoculé dans les veines avec le filtrat microbien, circule certainement aussi dans le sang des malades atteints de fièvres typho-paratyphoïdiques, chez lesquels on constate également, d'une façon générale, de la leucopénie et une mononucléose prononcée. Nous nous proposons donc de rechercher prochainement dans le sang et l'urine de tels malades, la présence de ce principe leucolytique, soit au moyen d'injections intraveineuses au lapin, soit au moyen d'une floculation par des sérums des lapins vaccinés. Si notre hypothèse se confirme expérimentalement, on aurait ainsi mis à la disposition des cliniciens un nouveau procédé de diagnostic de laboratoire des fièvres typho-paratyphoïdiques. On aurait, d'autre part, expliqué, dans une certaine mesure, l'évolution clinique de ces maladies, où la longue durée de l'affection ne cadre pas avec l'apparition précoce des anticorps spécifiques dans le sang des malades.

Le traitement spécifique des fièvres typho-paratyphoïdiques est actuellement, pour ainsi dire, inexistant. Ce traitement, croyons-nous, devrait être dirigé surtout contre l'intoxication générale. Or, puisque le sérum des lapins vaccinés avec les toxines typho-paratyphoïdiques formolées se montre riche en agglutinines et en précipitines spécifiques, et comme, d'autre part, ce sérum protège efficacement le cobaye contre l'infection péritonéale par des doses plusieurs fois mortelles des bacilles vivants, on peut se demander si le sérum d'un grand animal (cheval), préparé par des inoculations vaccinales des filtrats typho-paratyphoïdiques formolés, ne serait pas doué d'un pouvoir antitoxique et, par conséquent, thérapeutique chez l'homme ?

On peut enfin envisager la possibilité de vacciner préventivement l'homme contre les fièvres typho-paratyphoïdiques au moyen des toxines formolées, au lieu des corps microbiens actuellement employés. Les toxines formolées se sont montrées, en effet, absolument inoffensives pour les animaux de laboratoire, et doués d'un pouvoir antigène incontestable.

#### CONCLUSIONS.

1° Les filtrats des cultures sur bouillon des bacilles typhiques et paratyphiques B contiennent un principe antileucocytaire permettant le titrage de leur pouvoir toxique.

2° L'action de ces toxines sur les leucocytes se manifeste sous les deux aspects suivants : a) diminution rapide du nombre total des globules blancs avec, souvent, une hyperleucocytose consécu-

tive ; b) disparition complète ou presque complète des leucocytes polynucléaires.

3° Les filtrats, soumis à l'action du formol à 5 p. 1.000 pendant vingt à trente jours à 37°, perdent leurs propriétés toxiques pour le lapin, en général, et leur pouvoir leucolytique, en particulier.

4° Les lapins vaccinés avec les toxines formolées ou non formolées développent dans leurs sérums des quantités appréciables d'agglutinines et de précipitines spécifiques.

5° Les lapins et les cobayes vaccinés avec les toxines formolées se montrent réfractaires aux injections intraveineuses et intrapéritonéales des toxines et des microbes vivants, toxiques ou mortelles pour les animaux non vaccinés.

6° Le sérum des lapins vaccinés avec la toxine paratyphique B formolée protège les cobayes contre l'injection intrapéritonéale de doses plusieurs fois mortelles des bacilles vivants, lorsqu'il est injecté à ces animaux préventivement trente minutes plus tôt.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] GRASSET et GORY. *C. R. Soc. Biol.*, 1927, **96**, 180.
- [2] GRASSET et coll. *C. R. Soc. Biol.*, 1928, **98**, 435 ; 1931, **106**, 810.  
1931, **106**, 810.
- [3] REILLY, RIVALIER et STÉFANESCO. *C. R. Soc. Biol.*, 1930, **105**, 371.
- [4] MUTERMILCH (S.). *C. R. Soc. Biol.*, 1946, **140**, 767.
- [5] RAYNAUD (M.). *Soc. Franç. de Microbiol.*, 3 janvier 1946.
- [6] ROBERTSON ET YU. *J. Hyg.*, 1938, **38**, 299.
- [7] DENNIS et SENEKJIAN. *Am. J. Hyg.*, 1939, **30**, 21.
- [8] MORGAN. *J. Immunol.*, 1941, **41**, 161 ; *Proceed. Soc. Exp. Biol. a. Med.*, 1940, **43**, 529 et 1941, **48**, 114.
- [9] DELAUNAY. *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **137**, 590.
- [10] MUTERMILCH (S.). *C. R. Soc. Biol.*, 1946, **140**, 769 et 1947, **141**, 588.

# CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA MICROFLORE NITRIFICATRICE DES EAUX USÉES : RÉSISTANCE DES GERMES AUX CONDITIONS DÉFAVORABLES

par HÉLÈNE WINOGRADSKY (\*).

(Institut Pasteur. Service de M. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE.)

Poursuivant notre étude de la microflore nitrificatrice des eaux résiduaires, commencée en 1937 [1] et interrompue depuis, nous avons fait porter nos observations sur le comportement de cette florule dans les conditions artificielles de culture au laboratoire.

L'historique de la question est trop connu pour qu'il soit utile de le récapituler. Mentionnons pourtant les travaux de Harriett Chick [2], ainsi que l'opinion de Roubel [3] qui, dans une thèse sur les microbes nitrificateurs des filtres biologiques, émet l'opinion que le *Nitrobacter* isolé par lui serait « morphologiquement quelque peu différent » de son congénère du sol, mais se borne à conclure qu'il y a une « sensibilité moindre envers les substances organiques » chez les microbes des installations sanitaires.

Dans le présent travail, nous avons essayé de démontrer encore une fois la stabilité des biotypes qui appartiennent à ce groupe et la façon dont ils se comportent dans des conditions défavorables de culture *in vitro*.

*Expériences.* — L'expérience initiale a été la suivante :

19 mars 1946. Ensemencement de deux flacons bouchés à l'émeri, contenant 150 cm<sup>3</sup> de milieu de Van Niel (1) [4], pH à environ 8,5, avec 2 cm<sup>3</sup> d'un prélèvement provenant de la fosse septique d'une installation sanitaire type S. N. C. F. (Saint-Ouen-les-Docks). Notre but primitif était de rechercher des bactéries sulfuraires vraies pourpres selon la méthode de Van Niel. La culture n° 1 ne nous intéresse pas pour le moment, les végétations roses apparues appartenant à des espèces dont l'étude sera faite ailleurs.

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 7 octobre 1948.

(1) Formule du milieu synthétique minéral de Van Niel pour culture de bactéries sulfuraires vraies : chlorure d'ammoniaque, 1 g. ; phosphate bipotassique, 0,5 ; chlorure de magnésie, 0,2 g. ; bicarbonate de sodium, 1 g. ; monosulfure de sodium, 1 g. ; eau distillée, 1.000 cm<sup>3</sup>.



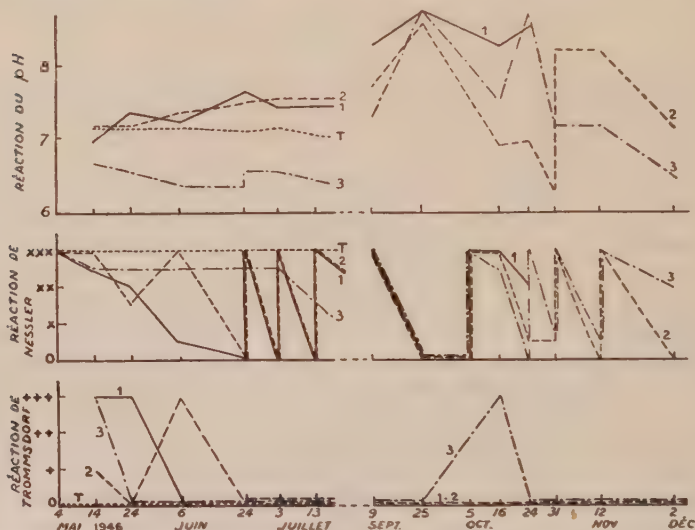
Culture n° 2 : les végétations sur le fond du récipient sont incolores. Examinée sept ou huit semaines après l'ensemencement, nous avons trouvé les réactions suivantes :

pH, 5,9 (2).

T . . . . . +++

N . . . . . XX

Si l'on prend en considération les réactions « T » et « N », une telle baisse du pH ne pouvait signifier qu'un début de nitrification. L'examen microscopique montre un mélange de formes *phytoléiques* et *kys-*



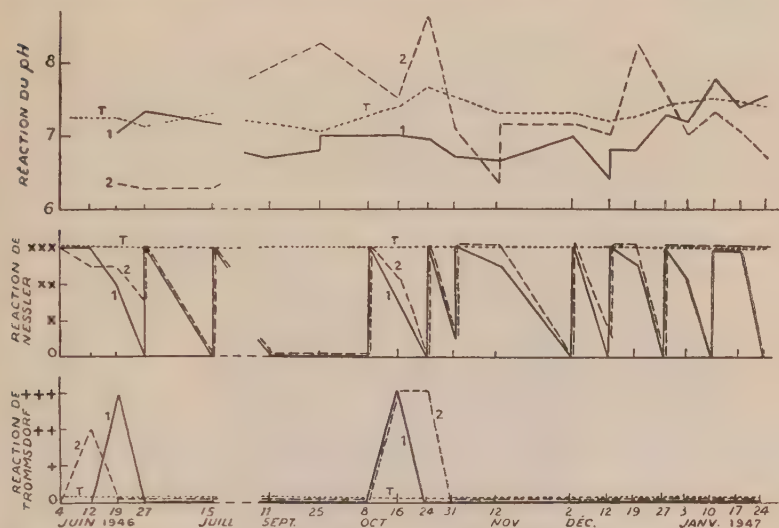
GRAPHIQUE 1. Marche de la nitrification dans une série de fioles du 4 mai 1946. Premier repiquage en milieu spécifique de la culture n° 2 du 19 mars 1946. (milieu de van Niel).

tiques, composées d'éléments de toutes tailles, ainsi que de cellules sphériques, et « en coin ». Tableau très caractéristique pour une culture brute de nitrifiants (3) [fig. 1, pl. p. 39].

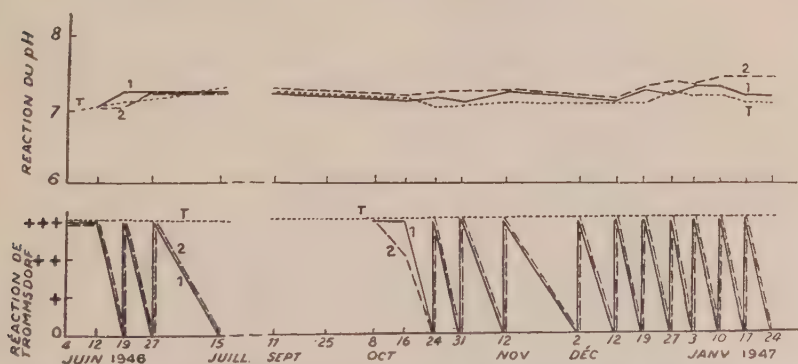
(2) Pour toutes les expériences, le pH a été pris colorimétriquement avec un comparateur de Hellige, en prélevant environ 2 cm. de la culture dans un petit tube à hémolyse. Les réactions Trommsdorf pour les nitrites, de Nessler pour l'ammoniaque, sont désignées par la lettre « T » et « N » respectivement. Les termes *Nitroso* et *nitro* sont employés pour désigner les bactéries à fonction nitritante et nitratante respectivement.

(3) Le phénomène a déjà été observé par nous dans des conditions analogues, avec cette différence qu'il s'est produit dans une culture pour *Leucothiobactéries*, avec un pH ajusté plus bas et dans une culture gardée à l'obscurité.

La meilleure façon de poursuivre l'étude du phénomène nous semblait la suivante : 1° Démontrer que les formes observées appartiennent aux groupes des nitrificateurs. 2° Dans l'affirma-



GRAPHIQUE 2. — Marche de la nitrification dans une série de deux fioles du 4 juin 1946. Repiquage de la série du 4 mai 1946. Deuxième génération après la culture du 9 mars 1946.



GRAPHIQUE 3 — Marche de la nitrification dans une série de deux fioles du 4 juin 1946. Même génération que graphique 2, en milieu spécifique liquide à nitrite de potasse.

tive, démontrer que les espèces sont des biotypes stables. Enfin, 3° éprouver leur résistance dans des conditions défavorables.

*Première série d'expériences.* — Repiquage en milieu électif spécifique :

4 mai 1946. Un lot de trois fioles d'Erlenmeyer de 150 cm<sup>3</sup> contenant 50 cm<sup>3</sup> de milieu de Winogradsky [5], tamponné avec 0,1 g. de CaCO<sub>3</sub> léger, donnant un pH de 7,1 à 7,2, additionné d'une solution de sulfate d'ammoniaque à 5 p. 100, avec 0,5 cm<sup>3</sup> de la culture n° 2. Le processus de nitrification commence au bout de huit à dix jours et continue d'une façon parfaitement normale, même assez intense. L'examen microscopique révèle le même mélange d'espèces que l'on avait observé chez la culture mère (voir le graphique 1, qui montre la marche du processus dans cette culture. On remarquera que les épreuves de Trommsdorf et de Nessler ont été faites à des intervalles de six à huit jours, et que l'énergétique a été ajouté aux cultures où on l'a trouvé épuisé. Ceci explique la forme en dents de scie de la courbe. Les cultures ne sont pas pures, raison pour laquelle la courbe des

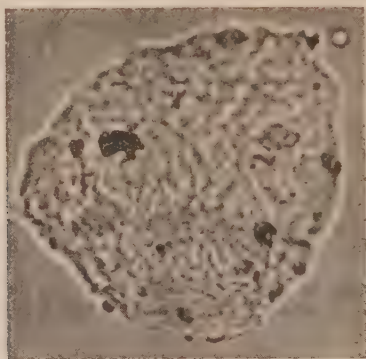


FIG. 3. — Troisième génération en milieu liquide spécifique nitro.  
Kyste de *Nitrocystis*.

réactions de Trommsdorf reste étalée par endroits : le nitrite étant oxydé aussitôt formé. Les mêmes explications sont valables pour les graphiques qui suivent).

Ce résultat pouvait donc être considéré comme positif : les organismes observés dans le milieu de Van Niel étaient bien des bactéries nitrifiantes.

*Deuxième série d'expériences. — Stabilité du biotype.*

4 juin 1946. Repiquage de la culture n° 3 du lot ci-dessus dans une série de quatre fioles d'Erlenmeyer : deux à solution ammoniacale et deux à nitrite de potasse. Les réactions microchimiques montrent une marche normale du processus et l'examen microscopique révèle la même profusion de formes *kystiques* dans leurs enveloppes de glaire épaisse (graph. 2 et 3) [fig. 2, pl. p. 39]. Il est à remarquer que les formes *kystiques* prédominent chez les bactéries nitrifiantes : formes ressemblant beaucoup à celles qui avaient été isolées des boues activées (*loc. cit.*) [fig. 3 dans le texte].

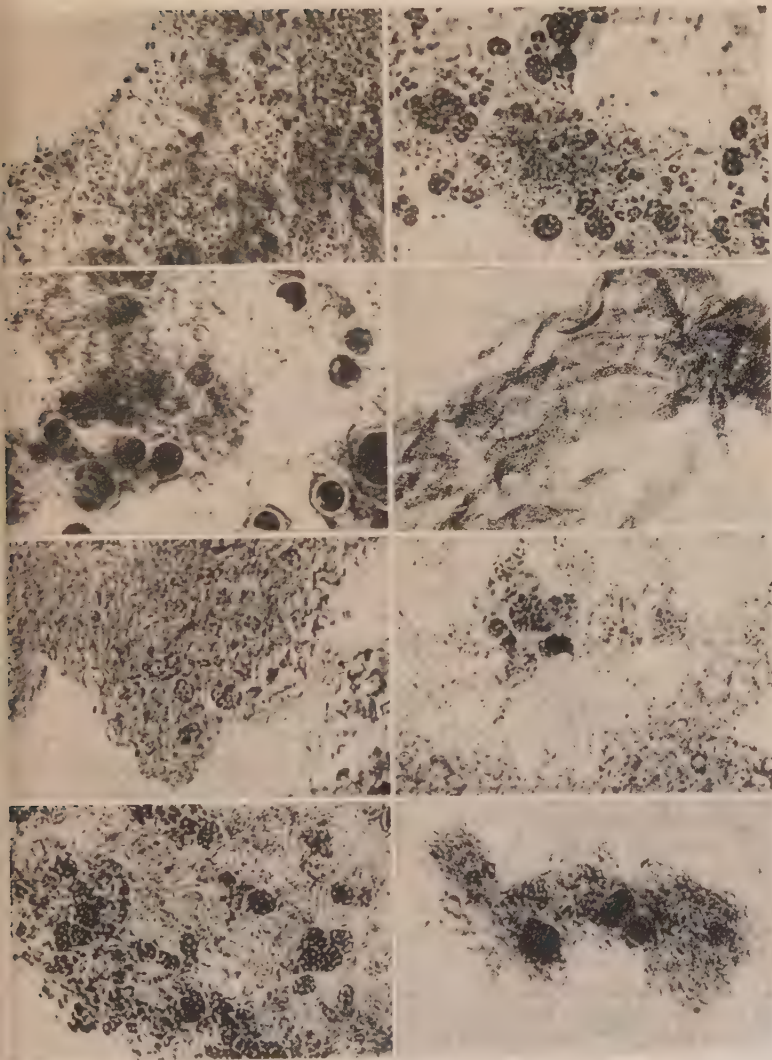


FIG. 2.

Fig. 1. — Premières végétations en milieu de van Niel. (Culture n° 2 du 19 mars 1946.) — Fig. 2. — Premier repiquage en milieu spécifique nitroso. (Culture n° 2 du 4 mai 1946.) — Fig. 3. — Première génération en milieu spécifique nitroso de la culture du 7 mai 1946. (Culture-fille n° 2 du 19 mars 1946.) — Fig. 4. — Culture dégénérée. Processus arrêté. Kystes d'*Amibes* et de *Nitrocystis* avec parois très épaisses. — Fig. 5. — Repiquage de la seconde génération en milieu de van Niel en milieu spécifique nitroso. Lambeaux de glaire avec kystes et phytogloées. — Fig. 6. — Même préparation que figure 7. — Fig. 7. — Culture en milieu de van Niel. Ensemencement d'un prélèvement du 9 avril 1946. Le caractère des végétations est le même. (Clichés du Service photographique de l'Institut Pasteur.) Toutes les figures sont au grossissement 1.450 sauf la figure 7, qui est au grossissement 450.

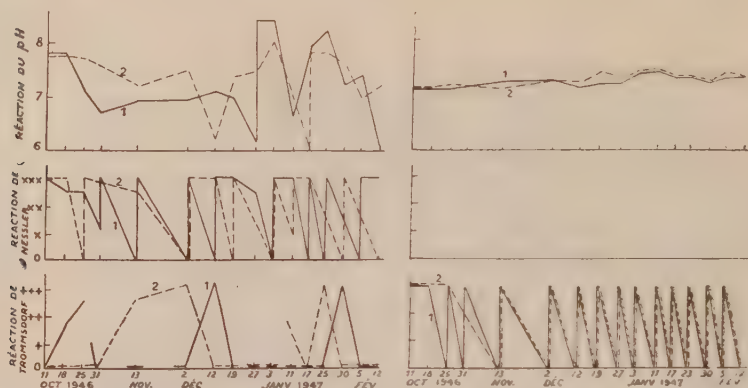
FIG. 5.

FIG. 7.

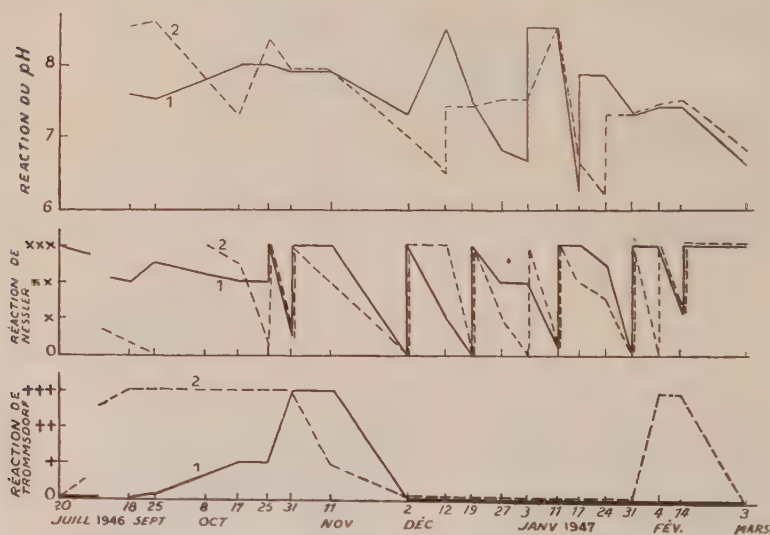
FIG. 9.



Une expérience de contrôle, faite en repiquant les cultures *nitro* en milieu *nitroso*, confirme ce fait, car il n'y a pas de processus en milieu ammoniacal.



GRAPHIQUE 4. — Marche de la nitrification dans une série de fioles mixtes (ammoniacque et nitrite de potasse). Cultures-filles de la série du 4 mai 1946. Repiquage en milieu spécifique après cinq mois de culture.



GRAPHIQUE 5. — Marche du processus dans une série de fioles du 20 juillet 1946 en milieu spécifique liquide. Repiquage de la deuxième génération en milieu de van Niel. Lent au début, gagnant en intensité.

Entre temps, d'autres repiquages ont été faits, de sorte que nous avons pu observer les pullulations jusqu'à la quatrième et la cinquième génération des cultures-filles à partir du flacon n° 2 du 19 mars 1946 (graph. 4) [fig. 3 et 4, pl. p. 39].

Comme le montrent les graphiques et les figures, le cours du processus reste à peu près le même, ainsi que le tableau microscopique (4).

Il nous semble donc que la stabilité du biotype se trouve prouvée.

*Troisième série d'expériences.* — Résistance des souches en observation.

7 mai 1946. Repiquage de la culture n° 2 du 19 mars 1946 en milieu de Van Niel à pH 8,5. Au bout de dix semaines, la culture est examinée. On trouve :

pH . . . . .	6,9 à 7,0
T. . . . .	+++
N . . . . .	XXX

Mais on y trouve les mêmes espèces à végétation *phytoléique* et *kystique*.

20 juillet 1946. Cette culture est repiquée en milieu spécifique pour nitrificateurs et on trouve que le phénomène se répète jusqu'à la troisième génération (fig. 5, pl. p. 39).

Donc la vitalité des souches ne semble pas être atteinte, même après un « mauvais départ » (fig. 7 et 8, pl. p. 39).

Il s'agissait ensuite d'éprouver la *résistance* de ce groupe de souches.

Dans ce but, des repiquages périodiques de la même culture-mère (n° 2 du 19 mars 1946) sont faits en milieu spécifique (nitroso et nitro) le 20 juillet 1946 et le 11 décembre 1946. Dans la première de ces séries, le processus a lieu, mais il est plus lent à commencer (graph. 5). Dans la seconde série, il est presque nul. A l'examen microscopique, on s'aperçoit que les cellules sont dégénérées ; elles prennent mal le colorant, ce qui, chez ces microbes, indique un état de souffrance ; le tableau est complexe et peu caractéristique (fig. 6, pl. p. 39).

Nous constatons donc qu'il y a tendance à une diminution de la vitalité, si des conditions défavorables sont *imposées* à ces microbes *in vitro*, phénomène qui ne se produirait pas dans la nature, où ils sont libres de rechercher les conditions qui leur conviennent. On pourrait poser la question de l'influence des saisons sur les cultures au laboratoire. Les mêmes expériences de culture, dans des conditions identiques, avec un prélèvement fait le 15 novembre 1946, n'ont pas donné des pullulations de nitrificateurs en milieu de Van Niel, tandis que le processus avait lieu normalement en milieu électif spécifique. On observe néanmoins une faible activité nitrificatrice, les agents étant plus résistants aux conditions défavorables.

*Discussion.* Il découlerait donc, des données obtenues, que les bactéries nitrifiantes — pourvu que les germes se trouvent dans le prélèvement — sont capables de se développer dans des condi-

(4) Nous avons refait des expériences de culture, exactement semblables avec un autre prélèvement de la même provenance (du 9 avril 1946) et nous avons obtenu des résultats concordants (fig. 9, pl. p. 39).

tions qui ne leur sont pas favorables : en milieu contenant des substances organiques et avec une pression d'oxygène réduite, en présence d'hydrogène sulfuré et à un pH à la limite de l'optimum. L'effet de ces facteurs — pression d'oxygène réduite — a été démontrée par Meyerhoff [6] dans ses expériences sur la respiration de ces microbes, quoique, comme le remarque Winogradsky (*loc. cit.*), « cette observation n'est valable que pour la souche qui a servi aux expériences ». Nous tenons à souligner que nous ne considérons pas nos résultats comme applicables à *tous* les cas qu'un chercheur pourrait rencontrer, car les conditions écologiques dans les milieux naturels — ou para-naturels, comme le sont les eaux d'égout — sont très probablement sujettes à des variations qu'il nous est impossible de prévoir ou de reproduire au laboratoire.

Ainsi, pour *cet ensemble* de souches, nous ne pouvons qu'enregistrer quelques phénomènes, qui nous semblent le mériter, et qui apportent une autre confirmation au fait que les bactéries nitrifiantes des eaux usées appartiennent à une microflore adaptée à des milieux défavorables et sont protégées par leurs gaines glaireuses contre les substances qui leur seraient toxiques.

On pourrait nous reprocher d'avoir travaillé avec des cultures qui n'étaient pas pures, et de n'avoir pas fait d'isolements. Nous avons procédé ainsi dans le but de créer des conditions de culture se rapprochant le plus possible des conditions écologiques du milieu naturel de ces microbes.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] WINOGRADSKY (Hélène). *Ces Annales*, 1937, **58**, 326.
- [2] HARRIETT CHICK. *Proceed. Roy. Soc.*, 1906, **77**, 241.
- [3] Cité par WINOGRADSKY (S.). *Ces Annales*, 1933, **50**, 350.
- [4] VAN NIEL (C. B.). *Arch. Mik.*, 1931, **3**, 1.
- [5] WINOGRADSKY (S.). *Ces Annales*.
- [6] MEYERHOFF (O). *Pflügers Arch. ges. Phys.*, 1916, **164** ; *Ibid.*, 1916, 229 ; *Ibid.*, 1917, **166**, 240.

## LA LYSÉ BACTÉRIOPHAGIQUE PAR ENTRAÎNEMENT

par R. WAHL et M<sup>me</sup> J. JOSSE-GOICHOT (\*).

(Institut Pasteur.)

Un certain phage 5 L, isolé de l'eau d'égout, s'est montré actif, entre autres, sur la souche *Streptococcus lactis* I<sub>1</sub> de notre collection. Par contre, la souche Leg 5 figurait parmi celles qui étaient résistantes à ce phage.

Cependant, nous avons constaté, au cours d'essais systématiques, que dans l'eau peptonée glucoséeensemencée avec la souche résistante Leg 5 et ce bactériophage, il suffit d'ajouter une petite quantité (1/10 de la quantité de la souche Leg 5ensemencée) de la culture de la souche sensible I<sub>1</sub>, pour obtenir, après une phase de croissance notable, une lyse complète de la culture.

Le présent travail a pour but d'étudier ce phénomène, auquel nous proposons de donner le nom de *lyse par entraînement*.

Tout d'abord, pour bien préciser sa signification, nous allons montrer que, d'une part, la souche Leg 5 est bien totalement résistante au phage 5 L en l'absence de souche I<sub>1</sub>, et que, d'autre part, la lyse par entraînement correspond à une multiplication du phage aux dépens de la souche Leg 5.

TECHNIQUE. — Le milieu utilisé dans les expériences qui vont suivre est de l'eau peptonée à 3 p. 100, glucosée à 3 p. 100, à pH : 7,5 ; les filtrations sont faites sur bougie L<sub>3</sub> ; les titrages sur boîte de gélose nutritive glucosée se font par la méthode des plages. Le titre est calculé pour 1 cm<sup>3</sup>, les ensemencements se font habituellement avec 6.10<sup>6</sup> microbes de Leg 5 par centimètre cube de milieu et 2.10<sup>3</sup> phages par centimètre cube.

1° La souche Leg 5 est totalement résistante au phage 5 L, au sens où on entend d'habitude cette résistance. En effet, si on ensemence cette souche Leg 5 avec un lysat filtré de la souche I<sub>1</sub>, par ce même phage, on n'obtient jamais de lyse. La lyse ne se produit pas non plus, quelles que soient les proportions de germes et de phages mis en présence. On n'observe jamais de multiplication du bactériophage. Le phage étalé sur plaques de gélose avec la souche Leg 5 ne donne jamais de plages.

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 4 novembre 1948.



Enfin la souche Leg 5 est incapable de fixer le phage à aucun moment de son existence.

*Expérience* : Nous mettons en contact à 37° dans plusieurs préparations un nombre de microbes résistants égal au nombre de phages. A intervalles déterminés (un quart d'heure, une demi-heure, une heure et demie, deux heures et quart, trois heures, quatre heures, cinq heures) nous titrons, après centrifugation, les phages dans le surnageant par la méthode habituelle. Le titre final de chaque préparation est exactement le même que le titre initial.

2° *La lyse par entraînement est liée à une multiplication des phages aux dépens de la souche Leg 5* qui se lyse. En effet, au lieu de voir ces germes se multiplier, on les voit rapidement diminuer de nombre.

*Expérience* : Après une heure, deux heures, trois heures, quatre heures d'étuve à 37° on titre parallèlement les microbes résistants de deux tubes, l'un ensemencé avec la souche Leg 5, l'autre avec la souche Leg 5 additionnée d'une petite quantité de souche sensible I<sub>0</sub> et du phage. Après quatre heures nous avons 15.10<sup>6</sup> microbes par centimètre cube dans le tube témoin et seulement 3.10<sup>5</sup> par centimètre cube dans le tube où se produit la lyse par entraînement. Par ailleurs, si on ensemence parallèlement un tube avec la souche Leg 5, le phage et une petite quantité de souche I<sub>0</sub>, et un autre avec la même quantité de phage et de souche I<sub>0</sub>, sans souche Leg 5, on obtient dans le premier cas une multiplication plus grande que dans le second. Ainsi 9.10<sup>4</sup> microbes sensibles par centimètre cube ensemencés avec 2.10<sup>3</sup> phages par centimètre cube donnent un titre de 3.10<sup>5</sup> phages par centimètre cube ; tandis que, en ajoutant à l'ensemencement précédent 6.10<sup>6</sup> microbes résistants par centimètre cube, on obtient un titre de  $1,02 \times 10^8$  par centimètre cube.

*Il s'agissait donc de rechercher le mécanisme de la lyse par entraînement ainsi définie.*

La première idée qui venait à l'esprit était que certains phages, après s'être multipliés aux dépens des germes sensibles, se trouvaient dans un état particulier qui les rendaient aptes à se fixer sur la souche Leg 5 et à la lyser. Il y aurait eu une sorte de mutation de ces phages.

La deuxième hypothèse possible était que le Str. Leg 5 avait acquis une propriété nouvelle (la sensibilité au phage 5 L) au contact du complexe : souche sensible-bactériophage.

*L'expérience n'a pas confirmé la première hypothèse.* En effet, nous avons d'abord essayé de diminuer la quantité de souche I<sub>0</sub> nécessaire à la lyse par entraînement par emploi de doses décroissantes de I<sub>0</sub>. Nous ne sommes pas arrivés à réduire ce nombre

au-dessous de 230.000 à 460.000 microbes sensibles par centimètre cube. A partir de ce nombre, le premier lysat par entraînement obtenu était filtré, puis utilisé dans une deuxième lyse par entraînement dans les mêmes conditions ; ce deuxième lysat servait dans une troisième lyse. Quatre passages successifs visant ainsi à adapter le phage à la lyse de la souche Leg 5 en l'absence de la souche I<sub>o</sub> n'ont donné aucun résultat.

Le phage ne subissant pas de mutation, nous nous sommes demandé si la multiplication du phage dans la culture de la souche Leg 5 était possible en dehors de la présence de microbes vivants de la souche I<sub>o</sub>, et si elle n'était pas provoquée par la seule adjonction d'une certaine quantité du milieu dans lequel I<sub>o</sub> et le phage s'étaient multipliés.

1° Nous avons séparé I<sub>o</sub> de Leg 5 par un sac de collodion.

*Expérience* : Une fiole de Fourneau de 500 cm<sup>3</sup> contenant 350 cm<sup>3</sup> d'eau peptonée glucosée étaitensemencée avec 6.10<sup>6</sup> microbes de la souche I<sub>o</sub> par centimètre cube et de 2.10<sup>3</sup> phages par centimètre cube. A l'intérieur de cette fiole un tube de verre terminé par un sac de collodion plonge dans le liquide ; ce sac contient 6 cm<sup>3</sup> du même milieu et estensemencé par la souche Leg 5 et le phage 5 L (mêmes proportions que précédemment). La lyse ne se produit pas à l'intérieur du sac ; elle est totale à l'extérieur, un titrage du liquide contenu dans le sac montre qu'il n'y a eu aucune multiplication du phage.

2° Les lysats filtrés sur bougie, sur filtre de verre fritté ou sur filtre Seitz, se sont montrés incapables de provoquer la lyse de la souche Leg 5.

3° Nous avons essayé de provoquer la lyse par entraînement avec des cultures de germes sensibles stérilisées par centrifugation. L'expérience a montré qu'il était impossible d'obtenir la stérilité même à une vitesse de 12.000 t./m.

4° Nous avons alors tué les germes restant dans le surnageant par le thymol ou la chaleur ; les surnageants ainsi traités ont été inactifs.

5° Les essais d'extraction d'une substance provoquant la lyse par entraînement (par autolyse des germes sensibles dans l'eau distillée) n'ont donné aucun résultat.

La présence des microbes sensibles vivants paraissant donc indispensable, nous avons repris nos expériences faites après centrifugation.

Nous avons vu que des lysats simplement centrifugés, mais non filtrés provoquaient la lyse par entraînement de la souche Leg 5 sans addition de la souche I<sub>o</sub>. Le maximum du taux de multiplication du phage était atteint avec une culture en train de lyser ayant trois quarts d'heure d'étuve ; une culture ayant plus de trois heures d'étuve était sans action.

*Expérience* : Cinq tubes contenant 9 cm<sup>3</sup> d'eau peptonée glucosée sont ensemencés chacun avec 6.10<sup>6</sup> germes par centimètre cube d'une culture de dix-huit heures de I<sub>0</sub> et 2 × 10<sup>3</sup> phages par centimètre cube. Les préparations sont retirées de l'étuve après un quart d'heure, une demi-heure, trois quarts d'heure, une heure et demie, deux heures et quart, trois heures, centrifugées, puis titrées. Une autre série de 5 tubes est ensemencée avec 6.10<sup>6</sup> microbes Leg 5 par centimètre cube et chacun reçoit une certaine quantité d'une des préparations précédentes, de façon à nous trouver en présence dans chacun de 1 × 10<sup>3</sup> phages par centimètre cube. Des titrages, effectués après quatre heures d'étuve à 37°, montrent une multiplication aux dépens de la souche Leg 5, variable suivant l'âge de la préparation ajoutée, avec maximum après trois quarts d'heure. Nous arrivons au même résultat, si nous ajoutons à l'ensemencement de Leg 5 à la fois du phage filtré et une certaine quantité du surnageant d'une culture de souche I<sub>0</sub> très jeune centrifugée. Ici encore le maximum d'activité est atteint au bout de trois quarts d'heure d'étuve et toute activité disparaît après trois heures.

*Expérience* : Un ballon contenant 50 cm<sup>3</sup> d'eau peptonée glucosée est ensemencé avec une culture de dix-huit heures de I<sub>0</sub> à raison de 6.10<sup>6</sup> microbes par centimètre cube, et placé à 37°. 10 cm<sup>3</sup> de la culture sont prélevés après un quart d'heure, une demi-heure, une heure et demie, deux heures et quart, trois heures d'étuve, puis centrifugés. Un prélèvement de 5 cm<sup>3</sup> du surnageant est effectué, puis on ajoute 5 cm<sup>3</sup> d'eau peptonée glucosée à chaque prélèvement de 5 cm<sup>3</sup>. Ces 10 cm<sup>3</sup> sont ensemencés avec 6.10<sup>6</sup> microbes par centimètre cube de la souche Leg 5 et avec le phage filtré à raison de 2.000 phages par centimètre cube. Après quatre heures d'étuve à 37° les 5 préparations différentes sont titrées ; on titre parallèlement les témoins (tableau I) indiquant les titres obtenus après addition de cultures en train de

TABLEAU I. — Comparaison des taux de multiplication du bactériophage sur la souche résistante entraînée et sur les microbes sensibles seuls.

TEMPS D'ÉTUVE	TITRE DONNÉ par Leg 5 entraînée avec des lysats centrifugés et non filtrés	TITRE DONNÉ par Leg 5 entraînée avec le surnageant de I <sub>0</sub> centrifugée + phage	TITRE DONNÉ par I <sub>0</sub> seule + phage
1/4 d'heure. . . . .	1,89.10 <sup>6</sup>	6,3. 10 <sup>5</sup>	3. 10 <sup>5</sup>
3/4 d'heure. . . . .	4,2. 10 <sup>7</sup>	1,44.10 <sup>8</sup>	3. 10 <sup>5</sup>
1 h. 1/2. . . . .	6,3. 10 <sup>6</sup>	3,15. 10 <sup>7</sup>	3,9. 10 <sup>6</sup>
2 h. 1/4. . . . .	9. 10 <sup>4</sup>	9. 10 <sup>5</sup>	1,5. 10 <sup>6</sup>
3 heures. . . . .	7,91.10 <sup>5</sup>	2,10. 10 <sup>6</sup>	1,56.10 <sup>7</sup>

lyser ou de cultures jeunes de  $I_0$  ayant séjourné un temps variable à l'étuve).

Nous en avons conclu que les germes sensibles étaient effectivement nécessaires. Il nous restait toutefois à déterminer la quantité de germes sensibles indispensable à ajouter pour provoquer la lyse par entraînement de la souche Leg 5. Il nous a fallu un minimum de 28.000 cellules sensibles par centimètre cube pour provoquer une multiplication du phage dix fois plus forte que celle donnée par les seules cellules sensibles. Si nous ajoutions un nombre de cellules sensibles supérieur à 28.000 par centimètre cube, la multiplication était de dix à cent fois plus importante. Enfin nous avons vu que pour provoquer la lyse visible de Leg 5, il fallait nous trouver en présence d'un nombre variant de 230.000 à 460.000 cellules de  $I_0$  par centimètre cube.

*S'il était établi que la présence des germes sensibles était indispensable*, elle ne suffisait pas à tout expliquer. En effet, si dans le cas d'une culture subissant la lyse, on aurait pu admettre que la disparition de l'activité correspondait à la mort de tous les germes sensibles, l'explication n'était plus valable quand il s'agissait d'un surnageant d'une culture centrifugée de  $I_0$ , non additionnée de phage. Au bout de deux heures la croissance est encore en pleine activité et la culture contient beaucoup de germes très jeunes. Comment expliquer que le maximum d'activité de la culture corresponde à trois quarts d'heure d'incubation ?

L'expérience a prouvé, en effet, que les germes débarrassés du milieu où ils ont poussé ne suffisaient pas à provoquer la lyse par entraînement.

*Expérience :* Une culture de trois quarts d'heure de  $I_0$  était centrifugée ; on prélevait le surnageant où on faisait une numération des germes vivants ; le culot était lavé à deux reprises avec de l'eau physiologique, puis remis en suspension dans 5 cm<sup>3</sup> d'eau physiologique. On faisait une numération des germes vivants dans la suspension. La souche Leg 5 était ensemencée avec le phage et la préparation du surnageant d'une part, et, d'autre part, avec le phage et la suspension de microbes lavés, ceci de façon à mettre un nombre identique de microbes sensibles dans les 2 cas.

Dans le premier cas, la lyse par entraînement se produisait et la multiplication finale était dix fois supérieure à la multiplication donnée par les seules cellules sensibles.

Dans le deuxième cas, il n'y avait pas de lyse par entraînement, la multiplication finale étant la même que celle donnée par la souche  $I_0$  en suspension dans l'eau physiologique (tableau II).

Nous avons alors ajouté à la fois, dans une expérience, 5 cm<sup>3</sup>



TABLEAU II

NOMBRE DE CELLULES sensibles par centimètre cube	SURNAGEANT	CULOT	TÉMOIN (cellules sensibles seules)
27.200 . . . . .	9. $10^4$	8. $10^5$	6. $10^5$
13.600 . . . . .	2,10. $10^4$	9. $10^5$	3. $10^5$
6.800 . . . . .	1,02. $10^4$	9. $10^5$	7,5. $10^4$
1.300 . . . . .	1,62. $10^3$	1,2. $10^5$	1,2. $10^4$
136 . . . . .	7,5. $10^4$	6. $10^4$	6. $10^4$

de surnageant *filtré* d'une culture de trois quarts d'heure de la souche  $I_9$  et la suspension en eau physiologique des microbes lavés du culot de centrifugation. La multiplication du phage s'est produite aux dépens de Leg 5, alors qu'elle n'avait lieu ni avec des microbes lavés seuls ni avec le filtrat seul.

On peut donc conclure que pour provoquer la lyse par entraînement du germe résistant Leg 5 par le phage 5 L, il faut la présence à la fois d'un petit nombre de germes sensibles  $I_9$  et d'une certaine quantité du milieu où s'est multipliée une culture jeune de  $I_9$ ; les meilleurs résultats étant obtenus au bout de trois quarts d'heure.

DISCUSSION. — Dans le phénomène que nous avons étudié sous le nom de lyse par entraînement, il y a véritablement multiplication d'un phage aux dépens d'une souche qui lui est naturellement résistante dans les conditions habituelles; cet « entraînement » est lié à la présence d'une culture jeune d'une souche naturellement sensible à ce même phage.

Gratia [1] et Eugène Wollman [2] avec des staphylocoques, Alice Evans [3] avec des streptocoques ont observé des cas de lyse de souches résistantes en présence de souches sensibles; il est difficile de savoir s'ils sont de même nature que celui que nous présentons.

D'après Wollman, ses propres expériences devraient être interprétées comme des lyses non spécifiques de staphylocoques vivants ou morts, sans multiplication de phages; ces lyses seraient secondaires à la lyse spécifique du germe sensible. A. Evans n'a pas déterminé si le phage se multipliait aux dépens du germe résistant.

Dans notre cas, il semble qu'une substance inductrice apparaisse dans les cultures très jeunes du germe sensible. Associée au germe sensible lui-même, elle rendrait le germe résistant capable de fixer spécifiquement le phage. Cette substance serait très thermolabile, puisqu'elle disparaît dans une culture au bout

de trois heures. Elle peut se conserver quelque temps à la glacière.

Il s'agit donc d'une modification d'un caractère spécifique de la bactérie, lié à l'état de sa surface, comme celui qui entre en jeu dans l'agglutination spécifique. On peut en rapprocher les modifications de l'agglutinabilité des pneumocoques de type II cultivés en présence de polysaccharide de type III (Avery [4]).

Sur la nature de la substance inductrice de la lyse par entraînement, on ne peut rien affirmer actuellement, pas plus que sur celle des modifications que subit le germe sous son influence.

Cependant, nous devons signaler que nous avons observé spontanément chez la souche Leg 5 une mutation qui la rendait sensible au phage. On peut se demander si, dans le cas étudié ici, il ne s'agirait pas d'une modification d'ordre génétique, dont l'hérédité ne pourrait être mise en évidence à cause de la lyse de tous les mutants. L'existence d'une mutation spontanée de même ordre est un argument en faveur de cette hypothèse.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] GRATIA (A.). *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **123**, 1018.
- [2] WOLLMAN (E.) et WOLLMAN (M<sup>me</sup> E.). *C. R. Soc. Biol.*, 1932, **110**, 636.
- [3] EVANS (A.). *J. Bact.*, 1935, **29**, 40.
- [4] AVERY (O.) et MAG LEOD (C.). *J. exp. Med.*, 1944, **79**, 137.

## DOUZE ANNÉES DE SÉROTHÉRAPIE ANTISCORPIONIQUE

par ETIENNE SERGENT [*in memoriam*] (1).

(*Institut Pasteur d'Algérie.*)

De nombreux cas de mort dus à la piqure de scorpions étaient signalés naguère chaque année en Algérie, surtout dans le Sud-Est, et dans le Sud tunisien. C'est ainsi que le Dr Edmond Chaix a enregistré, dans la seule oasis de Touggourt, pendant l'année 1939, 400 envenimements dont 15 suivis de mort, et il donne comme titre au premier chapitre de sa thèse : « Le péril scorpionique dans l'Annexe de Touggourt » (2).

C'est pourquoi l'Institut Pasteur d'Algérie a commencé, en 1932, l'étude du venin des scorpions nord-africains (3), dans l'intention de préparer un sérum antiscorpionique. Les scorpions de l'Afrique du Nord appartiennent à une quinzaine d'espèces. Les plus intéressants pour le médecin, soit à cause de la gravité des accidents qu'ils provoquent, soit à cause de leur fréquence, sont :

*Prionurus australis* L. (grand, brun, à grosse queue), très répandu dans la partie orientale des steppes et du Sahara.

*Prionurus liouvillei* Pky. (noirâtre, à pinces fines), des steppes et du Sahara.

*Prionurus amoreuxi* Audoin (grand, jaunâtre), Sahara.

*Prionurus hoggarensis* Pky. (ressemble à *Pr. australis*, mais vert très sombre, presque noir), Sahara central.

*Buthus occitanus* Amrx. (petit, jaune clair, à pinces fines), fréquent partout, Tell et Sahara.

*Hottentota gentili* Pky. (grand, grêle, noir et très velu), partie occidentale du Sahara.

*Scorpio maurus* L. (petit, jaune brun, à grosses pinces), fréquent partout (4).

(1) Je remercie vivement de leur bonne collaboration M<sup>lle</sup> L. Pons, laborantine-cheffaine, et M<sup>me</sup> V. Ferré, laborantine.

(2) Les envenimements par piqures de scorpions dans l'annexe de Touggourt. Intérêt de la Sérothérapie. Thèse Fac. Méd. Alger, 1940.

(3) Cette étude n'a été possible que grâce à la bonne collaboration de nos confrères d'Algérie, de Tunisie et du Maroc, que nous remercions ici bien vivement.

(4) M. Max Vachon, du Laboratoire de Zoologie du Muséum National d'Histoire naturelle de Paris, poursuit en ce moment l'étude systéma-

De tous ces scorpions, le plus venimeux de beaucoup est *Priονurus australis*. C'est à lui surtout que sont dues les morts d'hommes.

Nous signalons, en raison de la singularité du fait, que *Buthus occitanus*, qui cause dans les régions littorales de l'Algérie des envenimements mortels, ne se distingue pas, d'après les entomologues, du *Buthus occitanus* du Languedoc et de nombreux pays du midi de l'Europe, dont la piqûre n'entraîne jamais la mort.

Pour l'étude au laboratoire du venin de scorpion, le mode simple et pratique de préparation que nous employons depuis seize ans nous a toujours donné des résultats constants et sûrs. Le telson desséché à 37° et conservé à l'ombre en tube scellé est finement broyé. Pour l'injection, la poudre est mise à macérer pendant quelques heures dans de l'eau stérile salée à 9 p. 1.000, dans des flacons contenant des perles de verre que l'on agite à plusieurs reprises.

L'animal de choix pour l'étude du venin de scorpion est la souris blanche. L'injection de la suspension de poudre de telson est faite à la souris sous la peau.

La dose minima mortelle de venin pour la souris de 20 g. a été recherchée pour 6 espèces de scorpions de l'Afrique du Nord.

La dose mortelle est de :

1/20 de telson pour *Prionurus australis* L.

1/15 de telson pour *Prionurus amoureuxi* Audoin.

1/12 de telson pour *Prionurus hoggarensis* Ptry.

1/2 de telson pour *Buthus occinatus* Amrx.

1/2 de telson pour *Buthus occitanus* Amrx.

3/4 à 1 telson pour *Hottentota gentili* Ptry.

7 telsons pour *Scorpio maurus* L.

Pour la préparation du sérum antiscorpionique nous employons des chevaux, malléinés et vaccinés contre le tétanos (5). Le venin à injecter est dilué dans l'eau salée, selon la méthode que nous avons décrite (6). Nous n'utilisons que le venin de *Pr. australis*, qui est le plus toxique.

Le titrage de l'activité du sérum antiscorpionique s'effectue

tique approfondie des scorpions du Nord de l'Afrique, effectuée avec les collections de l'Institut Pasteur d'Algérie. Cette étude est en cours de publication dans les *Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie*, 1948, 26, fasc. 1, 25-90, fasc. 2, 162-208. (A suivre.)

(5) Je suis bien reconnaissant à mes collègues du Service vétérinaire, MM. DONATIEN, PLANTUREUX et GAYOT de leur amicale collaboration.

(6) Etienne SERGENT, L'action du sérum antiscorpionique est renforcée quand on injecte en même temps de l'eau salée. *Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie*, 1943, 21, 24-27.



sur la souris (de 20 grammes environ). Un sérum est considéré comme bon quand il sauve de 80 à 100 p. 100 des souris traitées, dont les témoins, qui ont reçu la même dose de venin, meurent tous en moins de deux heures.

Le sérum préparé avec du venin de *Pr. australis* est également actif contre le venin des autres scorpions de l'Afrique du Nord. Les expériences de laboratoire ont montré que le sérum préparé avec le venin de *Pr. australis* protège également 9 souris sur 10 injectées avec le venin d'un autre *Prionurus* : *Pr. liouvillei*. Fait plus frappant, ce sérum, préparé avec du venin d'un *Prionurus*, sauve également 9 souris sur 10 ayant reçu une dose mortelle d'un scorpion appartenant à un autre genre : *Buthus occitanus*. Chez l'homme également, le sérum anti-*Pr. australis* guérit l'envenimement dû à la piqûre de *B. occitanus*. Nous avons vu nous-même, en 1944, un garçonnet de six ans qui, piqué par un *B. occitanus*, était entré dans le coma au bout de quelques minutes, renaître rapidement à la vie après une injection sous-cutanée de 20 centicubes de sérum anti-*Pr. australis*.

Le sérum antiscorpionique a été mis à la disposition des médecins en 1936. Depuis douze ans que les piqûres de scorpion sont traitées en Afrique du Nord par le sérum préparé par l'Institut Pasteur d'Algérie, nous avons reçu 4.057 observations de sérothérapie antiscorpionique relevées par des médecins. Nous ne tenons pas compte dans la statistique des cas bénins. Nous ne retenons pas non plus les cas signalés par le médecin traitant comme « sérieux mais non alarmants », où les symptômes dominants sont une vive souffrance, des vomissements, l'algidité, bien que chaque fois l'injection de sérum ait produit une amélioration rapide, très appréciée des malades. Si l'on ne considère, parmi ces 4.057 observations, que celles qui concernent les cas, au nombre de 1.003, où le médecin traitant écrivait que la vie était en danger (parfois le pronostic était même désespéré), on enregistre 923 guérisons. La proportion des guérisons est donc de 92 p. 100.

Parmi ces 923 malades dont l'état était alarmant, et qui ont été sauvés par le sérum antiscorpionique, 24 (2,5 p. 100) étaient des Européens, et 899 (97,5 p. 100) étaient des Indigènes musulmans (7).

(7) Pour la bibliographie des travaux effectués à l'Institut Pasteur d'Algérie sur les scorpions, voir les *Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie*, à partir du tome 11, 1933.

# ACCÉLÉRATION DE LA CICATRISATION DES PLAIES EXPÉRIMENTALES CONSÉCUTIVEMENT A L'INJECTION DE SÉRUM ANTI-RÉTICULAIRE

par J. LOISELEUR et F. ZAJDELA (\*).

(Institut Pasteur.)

Metchnikoff a, le premier, envisagé la possibilité de stimuler l'activité d'un organe par l'injection d'une faible dose du sérum cytotoxique correspondant, une forte dose devant au contraire exercer une action inhibitrice. Bogomoletz [1], d'ailleurs ancien élève de Metchnikoff, a transposé l'hypothèse sur un plan nouveau. Se basant sur l'importance fondamentale du système réticulo-endothélial, Bogomoletz a préparé un sérum anti-réticulo-endothélial (S. a-R. E.) dans le but de provoquer, par une faible dose de ce sérum, une excitation du système réticulo-endothélial et d'entraîner ainsi un « rajeunissement » général des tissus. La vérification expérimentale de l'efficacité de ce sérum est difficile et fait appel parfois à des méthodes compliquées, comme par exemple la modification de la prolifération de tumeurs greffées ou la réparation de fractures expérimentales [2].

Dans ce travail, nous avons choisi, comme test très simple, la cicatrization d'une plaie expérimentale de la Souris. Les résultats sont tellement nets que nous devons signaler dès maintenant l'augmentation considérable de la vitesse de cicatrization consécutivement à l'injection du sérum de lapin préparé, dans les conditions que nous indiquons, avec du tissu réticulo-endothélial de souris.

## I. — TECHNIQUE.

*Préparation de l'antigène.* — Conformément aux données de Bogomoletz, l'antigène est préparé avec un mélange de moelle osseuse, de ganglions lymphatiques et de rate.

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 7 octobre 1948.

A 15 souris (de 25 à 30 g.), tuées par sectionnement de la carotide, on prélève, en opérant dans la glace, les ganglions cervicaux (environ 250 mg.), la moelle des os longs (environ 10 mg.) et 7 rates (environ 1.750 mg.). Aussitôt prélevés, les tissus sont broyés au mortier avec 15 cm<sup>3</sup> d'une solution de NaCl (C = 7 p. 1.000, pH = 7,4), en présence de 5 g. de sable fin. Finalement, on ajuste à pH = 7,8 et on abandonne à la glacière. Après une heure, on centrifuge et on conserve la solution à la glacière en présence d'un cristal de thymol. L'antigène est utilisable pendant les dix jours qui suivent sa préparation.

*Préparation du lapin.* — L'antigène est administré au lapin (P = 2 kg.) en injections intraveineuses selon la cadence suivante :

1 <sup>er</sup> jour . . . . .	1 cm <sup>3</sup>	14 <sup>e</sup> jour . . . . .	4 cm <sup>3</sup>
5 <sup>e</sup> jour . . . . .	1 cm <sup>3</sup>	16 <sup>e</sup> jour . . . . .	4 cm <sup>3</sup>
7 <sup>e</sup> jour . . . . .	1 cm <sup>3</sup>	72 <sup>e</sup> jour . . . . .	4 cm <sup>3</sup> (injection de rappel).
9 <sup>e</sup> jour . . . . .	2 cm <sup>3</sup>	76 <sup>e</sup> jour . . . . .	4 cm <sup>3</sup>
12 <sup>e</sup> jour . . . . .	2 cm <sup>3</sup>	86 <sup>e</sup> jour . . . . .	Prélèvement du sérum.

Dès le vingt-deuxième jour, la  $\gamma$ -globuline, obtenue par fractionnement par le sulfate d'ammonium, était active, *in vitro*, vis-à-vis de l'antigène (augmentation caractéristique lors de l'épreuve de viscosité et floculation massive du mélange de 0,5 cm<sup>3</sup> d'antigène dilué au 1/10 et de 2,5 cm<sup>3</sup> de  $\gamma$ -globuline) ; mais l'activité biologique était nulle à cette date. Le sérum ne s'est montré efficace sur la réparation cutanée qu'au quatre-vingt-sixième jour, c'est-à-dire dix jours après les injections de rappel opérées aux soixante-douzième et soixante-seizième jours. Enfin, au cent unième jour, c'est-à-dire vingt-cinq jours après la dernière injection de rappel, le sérum était toujours actif sur la plaie ; il entraînait l'apparition d'une hyperleucocytose constante, mais sans accélérer la réparation cutanée. Cette apparition successive d'anticorps doués de propriétés variables peut résulter de la complexité du matériel antigénique. Les expériences suivantes ont été faites avec le sérum total, non purifié, prélevé le quatre-vingt-sixième jour.

*Plaie expérimentale de la souris.* — Cette plaie est obtenue en délimitant, dans la région dorso-lombaire médiane de la souris, un cercle de 1 cm. de diamètre. On utilise une sorte d'emporte-pièce [3] et on découpe aux ciseaux, sous anesthésie générale, la rondelle de peau correspondante en détachant la peau au niveau de son plan de clivage sur l'aponévrose des muscles. Dès le premier jour, la plaie est recouverte d'un exsudat jaunâtre qui se dessèche rapidement et forme, en général, croûte en deux jours environ. Cette croûte s'élimine entre le dix-septième et le vingtième jour environ.

## II. — ESSAI DU S. a—R. E. A FORTE DOSE.

20 souris blanches adultes provenant du commerce, d'un poids moyen de 22 g. (poids extrême 20 à 24 g.), sont réparties en deux cages contenant chacune 10 animaux.

Un premier lot sert de témoins.

Les souris de l'autre groupe subissent pendant dix jours une injection quotidienne sous-cutanée de 0,35 cm<sup>3</sup> de S. a—R. E. Le traitement commence cinq jours avant l'ablation de peau et est continué pendant les cinq jours consécutifs.

Le deuxième jour après l'ablation, les animaux traités présentent un aspect plus favorable des cicatrices et un meilleur état général.

Le quatrième jour, la cicatrisation est déjà très en avance par rapport au témoin.

Le dixième jour, toutes les croûtes sont tombées ; il ne reste qu'une petite cicatrice. Les animaux présentent un état général excellent. Au contraire, les animaux témoins ont encore conservé leurs grosses cicatrices et l'état général est moins bon.

Notons enfin que la mortalité a été la même dans les deux lots (2 animaux morts parmi les témoins et parmi les animaux traités au sérum).

Il est remarquable que ces observations intéressent la *totalité* des animaux traités.

Le treizième jour, l'action du sérum est encore plus manifeste, puisque 2 des animaux sont définitivement cicatrisés, les autres ne présentent plus qu'une légère cicatrice sur le point de disparaître.

La fig. 1, n<sup>os</sup> 1, 2, 3, 4, reproduit l'ensemble de l'expérience aux dixième et treizième jours. On a choisi au hasard 3 animaux dans chaque groupe, si bien que les photographies donnent une reproduction exacte de l'ensemble de l'expérience. On notera également la différence de l'aspect du poil entre les témoins et les animaux traités, ce qui permet de juger de la différence de l'état général.

## III. — ESSAI DU S. a—R. E. A DOSE FAIBLE.

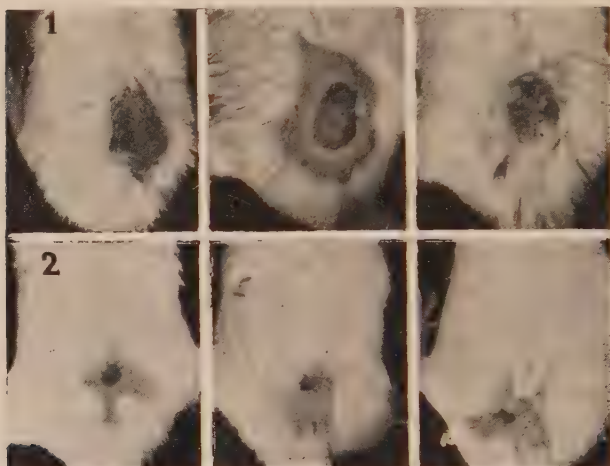
Le résultat précédent a été obtenu avec une forte dose de sérum pur, laquelle aurait dû être inhibitrice d'après l'hypothèse initiale. On doit donc s'attendre à constater, avec une faible dose — « dose stimulante » —, une accélération encore plus marquée de la vitesse de cicatrisation. En réalité, l'apparition d'accidents sériques vient compliquer l'observation.

L'expérience précédente comportait un 3<sup>e</sup> lot de 10 souris qui furent traitées avec le S. a—R. E. dilué au 1/50 dans NaCl

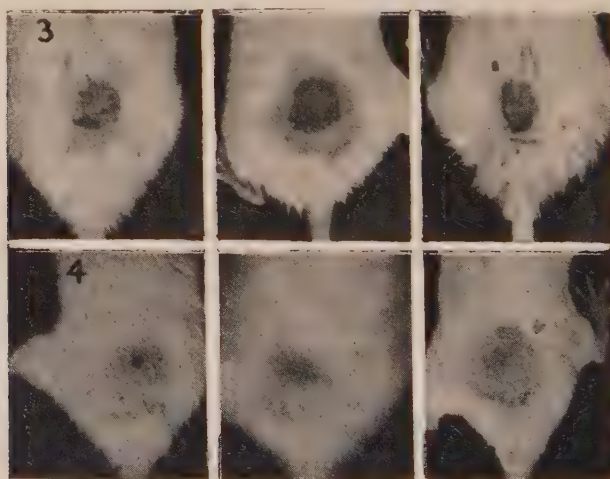


7 p. 1.000. Les animaux reçoivent le même nombre d'injections que les animaux traités avec le sérum pur.

FIG. 1. — *Expériences avec le sérum pur.*



Aspect de la cicatrice dix jours après l'ablation d'une rondelle de peau de 1 cm. de diamètre: 1° Témoins; 2° Animaux traités par le sérum pur.



Aspect de la cicatrice treize jours après l'ablation d'une rondelle de peau de 1 cm. de diamètre: 3° Témoins; 4° Animaux traités par le sérum pur.

L'histoire de ce groupe peut se diviser en deux périodes :

1° Du premier au sixième jour après l'ablation, c'est-à-dire pen-

dant une durée un peu plus grande que la période où les animaux subissent leur injection quotidienne de sérum, on est frappé par le mauvais aspect des animaux. La mortalité est très élevée (70 p. 100) : les animaux meurent dans les heures qui suivent l'injection ; dans deux cas, la mort survient immédiatement (quatre à cinq minutes) après l'injection. L'intervention de phénomènes anaphylactiques semble hors de doute, la souris ayant été sensibilisée par la faible dose de sérum de lapin. Quant à l'état des cicatrices, il est comparable à celui des témoins et manifestement en retard sur celui des animaux traités par le sérum pur.

2° *A partir du septième jour après l'ablation* (le traitement sérique a cessé depuis deux jours), le tableau se modifie profondément.

FIG. 2. — *Expériences avec le sérum dilué au 1/50.*



5° Aspect de la cicatrice au treizième jour sur les animaux traités par le sérum dilué au 1/50 (comparer avec les séries 3 et 4).

dément à mesure que s'améliore l'état général des animaux survivants. La cicatrisation progresse avec une rapidité remarquable, devient dès le dixième jour comparable à celle des animaux traités par le sérum pur. Le treizième jour, l'une des souris a achevé sa cicatrisation et les deux autres l'ont presque terminée. Les photographies des animaux à ce jour (fig. 2, n° 5) doivent être comparées à celles de la planche I, n° 2. On constate une très légère avance de la cicatrisation par rapport à celle des animaux traités par le sérum pur.

L'expérience montre donc : 1° qu'une faible dose de sérum (sérum dilué au 1/50) accélère d'une façon remarquable la cicatrisation ; 2° qu'une dose cinquante fois plus forte (sérum pur) possède un pouvoir stimulant presque aussi intense. Pour accorder avec ces constatations l'hypothèse initiale de Metchnikoff, nous dirons que la dose du 1/50 est « stimulante », mais qu'une dose cinquante fois plus élevée n'atteint pas encore la zone d'inhibition, en restant donc encore dans la zone de stimulation.

Il est bien évident que, les deux doses possédant pratiquement

la même action stimulante, l'expérimentation doit s'adresser au sérum pur, de façon à éviter les accidents sériques.

Quant à l'explication des faits, elle est difficile et cet exposé, volontairement limité à l'exposé des faits expérimentaux, ne peut faire place à la série des hypothèses auxquelles Bogomoletz fait appel.

Une particularité très importante doit être pourtant signalée, à savoir : l'infection constante de ces plaies expérimentales (1). Une explication de l'activité du sérum pourrait consister à admettre qu'une stimulation du système réticulo-endothélial entraîne une augmentation de la phagocytose et favorise ainsi la cicatrisation. Mais les phénomènes sont manifestement plus complexes. L'amélioration de l'état général montre que l'action du sérum ne reste pas localisée à la plaie expérimentale, mais intéresse tout un ensemble de fonctions organiques.

*En résumé*, le sérum du lapin préparé, pendant une durée très prolongée, avec un extrait de tissu réticulo-endothélial de souris, augmente considérablement la vitesse de cicatrisation d'une plaie expérimentale de souris. Employé à faible dose, ce sérum montre une activité légèrement supérieure, mais en entraînant des accidents sériques.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] BOGOMOLETZ (A. A.). *La Presse Médicale*, 1946, n° 55, 766.
- [2] STRAUSS (R.). *J. Immunol.*, 1946, **54**, 151.
- [3] Par la technique de LACASSAGNE (A.) et LATARJET (R.). *C. R. Soc. Biol.*, 1945, **139**, 443.

(1) Nous avons cherché à préciser, dans les conditions de notre technique, l'influence de l'âge de la souris sur la vitesse de cicatrisation. Des souris de quatre à six mois, comparées à des souris de vingt à vingt-quatre mois, présentaient, après vingt et un jours, la même cicatrisation. Les formules établissant les relations entre l'âge et la vitesse de cicatrisation, ne s'appliquent donc pas à la souris, vraisemblablement par suite de l'infection des plaies

# CONTRIBUTION A LA VACCINATION ANTIDYSENTÉRIQUE A L'AIDE DU VACCIN "T.C.M.A.L. (OH)<sub>3</sub>". IMPORTANCE DE LA VOIE INTRAMUSCULAIRE D'IMMUNISATION

par GH. ISTRATI, N. NESTORESCO, C. ZILISTEANU et MARIA ISTRATI.

(Institut J. Cantacuzène, Bucarest.)

De nombreux essais de vaccination antidysentérique à l'aide de vaccins préparés de différentes manières par Shiga, Castellani, Boehmke, Manduisakis, H. Moon et N. Kersten, R. Prigge, K. W. Clauberg et F. Sartorius n'ont pas encore donné de satisfaction. Qu'il nous soit permis de donner un très court résumé de ces méthodes et des résultats obtenus : (a) suspension de B. de Shiga tué (par chaleur, rayons X, lumière solaire, froid, etc.) ; (b) mélanges de B. de Shiga, d'anatoxine et de toxine ; ces méthodes n'ont stimulé qu'une quantité réduite d'antitoxine : en moyenne 1 UA/cm<sup>3</sup> (Prigge). Les vaccins préparés par Behringwerke n'ont pas donné non plus de meilleurs résultats (Clauberg et Sartorius).

A ce sujet il y a une différence marquée entre les vaccins « Shiga » et les vaccins « Flexner » utilisés jusqu'à présent ; ces derniers étant plus efficaces. Il est vrai que l'efficacité de l'immunisation anti-Shiga dépend d'une quantité suffisante de toxine, or, cette quantité utile, administrée par voie sous-cutanée, présente le gros inconvénient de provoquer de très fortes réactions et, le plus souvent, une nécrose des tissus. D'autre part, une anatoxine complètement détoxifiée n'immunise pas (R. Prigge).

Il nous restait donc à chercher la voie d'administration adéquate qui puisse permettre l'introduction d'un antigène efficace et éviter, si possible, les fortes réactions tissulaires signalées jusqu'à présent.

En 1942, l'un de nous a présenté à l'Académie Roumaine de Médecine (1) une communication préliminaire sur les premiers essais de vaccination anti-Shiga, en utilisant comme antigène une suspension de B. de Shiga traitée par le chloroforme ; cet anti-

(1) Gh. ISTRATI. *Bull. Acad. Méd. de Roumanie*, 1942, 42, 324.



gène, constitué d'une fraction protéinique et d'une fraction glucido-lipidique-polypeptidique et contenant un peu plus de 15 d.l.m. par centimètre cube, était adsorbé sur  $\text{Al}(\text{OH})_3$  afin d'augmenter sa valeur immunisante.

#### TECHNIQUE DE PRÉPARATION.

Cultures de vingt-quatre heures sur gélose 5 p. 100 de B. de Shiga-Kruse « S » D 26, suspension de corps microbiens en sérum physiologique, centrifugation et lavage des corps au sérum physiologique. Le culot microbien est émulsionné en sérum physiologique de manière à avoir 200 mg. de germes microbiens par centimètre cube. On ajoute 5 p. 100 de chloroforme ; autolyse à  $37^\circ$  pendant quarante-huit heures et trois jours à la température de la chambre en agitant le mélange deux à trois fois par jour. On centrifuge ensuite. Le liquide surnageant représente la toxine mixte (a) : titrage sur la souris (2.500 d.l. minima) et sur le lapin (300 d.l.m.). (b) En partant du culot microbien on fait une suspension de 2.000.000.000 de germes en 1  $\text{cm}^3$  d'eau physiologique phénolée à 0,2 p. 100 ; la toxicité de cette suspension est insignifiante. Le vaccin est donc constitué d'un mélange de toxine mixte et de corps microbiens épuisés, de manière à avoir 15 d.l.m. par centimètre cube, le tout adsorbé sur 7,5 p. 100  $\text{Al}(\text{OH})_3$ . Une dose de 0,25  $\text{cm}^3$  de vaccin tue 20 p. 100 des souris inoculées par voie sous-cutanée et 72 p. 100 des lapins inoculés par la même voie.

*Les animaux immunisés (souris 0,25  $\text{cm}^3$  et 0,5  $\text{cm}^3$ , lapins 0,1  $\text{cm}^3$  et 0,5  $\text{cm}^3$ ), résistent à une inoculation d'épreuve de 25 d.l.m. (souris i. v.) ; les lapins à 6 d.l.m. (voie intraveineuse) ; 50 p. 100 seulement des lapins résistent à une inoculation d'épreuve de 12 d.l.m.*

#### ESSAIS DE VACCINATION.

Le vaccin est inoculé chez l'homme strictement dans l'épaisseur de la longue portion du muscle triceps-brachial, le plus loin possible des fibres tendineuses ; on utilise une aiguille fine afin d'éviter que des gouttes de vaccin passent dans le tissu sous-cutané (qui est particulièrement irritable). Doses vaccinales : 0,25  $\text{cm}^3$  pour la première et 0,5  $\text{cm}^3$  pour la seconde injection.

A. Dans une première série de vaccinations chez l'homme (mentionnées dans notre communication préliminaire), sur 45 personnes, 39 ont reçu une seule inoculation de 0,25  $\text{cm}^3$  de vaccin par voie intramusculaire ; 6 autres ont reçu deux injections : 0,25  $\text{cm}^3$  et 0,5  $\text{cm}^3$ . 10 p. 100 seulement de ces personnes ont présenté une infiltration légère des tissus à l'endroit de l'inoculation ; cette infiltration n'a duré que deux à quatre jours.

*Contrôle de l'immunité.* — Quinze jours après la dernière inocu-

lation on a pratiqué chez nos vaccinés une injection intradermique avec quatre doses nécosantes de toxine protéinique de Shiga ; *aucun des vaccinés n'a présenté de réaction nécrotique locale.*

*Le mélange des sérums des personnes immunisées contenait en moyenne de 15 à 20 UA/cm<sup>3</sup> (unités antitoxiques).*

Un certain nombre des personnes vaccinées ont subi ensuite l'inoculation d'une quantité double de vaccin « anti-Shiga + anti-groupe Flexner » (0,5 cm<sup>3</sup> et 1 cm<sup>3</sup> respectivement) sans présenter aucun trouble local.

B. Un second groupe de 23 malades d'un hôpital pour maladies mentales (où des cas de dysenterie avaient paru) ont été immunisés comme suit : 17 ont reçu par voie intramusculaire une première inoculation de 0,25 cm<sup>3</sup> de vaccin anti-Shiga, les 6 autres 0,5 cm<sup>3</sup> de vaccin « anti-Shiga + anti-groupe Flexner ». Le pourcentage des réactions post-vaccinales n'a pas dépassé 10 p. 100, soit : céphalalgies, température, 37°8 à 38°, infiltration douloureuse locale pendant deux à quatre jours.

17 sur 23 des malades ayant reçu une seconde inoculation à double dose de vaccin, ont de nouveau mis en évidence l'innocuité de ce vaccin.

Dix jours après, une injection intradermique de quatre doses nécosantes de toxine protéinique Shiga a provoqué, dans 41 p. 100 des cas, une réaction positive suivie de nécrose. En pratiquant quinze jours après une seconde injection intradermique de toxine protéinique nous avons constaté dans 6 cas sur 7 une réaction positive ; le septième vacciné n'a présenté qu'une rougeur locale suivie de desquamation.

Le mélange des sérums des malades à réaction intradermique négative contenait 10 UA/cm<sup>3</sup> ; le mélange des sérums des malades à réaction positive contenait moins de 0,5 UA/cm<sup>3</sup>.

Le sérum du septième malade qui avait présenté *une réaction intradermique négative (limite)* à la suite de l'injection de quatre doses nécosantes de toxine protéinique Shiga contenait 1 UA/cm<sup>3</sup> ; ce dernier titre semble représenter la quantité minima neutralisante d'antitoxine du sérum des « réacteurs négatifs ».

C. L'éclosion d'une épidémie de dysenterie dans une unité militaire nous a fourni l'occasion d'essayer la vaccination par voie intramusculaire sur 260 soldats ; deux injections ont été pratiquées respectivement de 0,25 cm<sup>3</sup> et 0,5 cm<sup>3</sup> à quinze jours d'intervalle. On a constaté chez 10 p. 100 approximativement des vaccinés des réactions locales insignifiantes ; une légère gêne locale leur permettant cependant de continuer leur préparation militaire, malgré leur état de fatigue et d'alimentation médiocre. En tout cas l'intensité des réactions était inférieure à celle de la vaccination à T. A. B.

Une intradermo-réaction à quatre doses nécrisantes de toxine Shiga pratiquée quinze jours après la dernière vaccination montrait 52,3 p. 100 de réactions négatives. Trois mélanges de sérum provenant de 50 de ces soldats contenaient de l'antitoxine, respectivement : premier mélange, 10 UA/cm<sup>3</sup> ; deuxième mélange, 20 UA/cm<sup>3</sup> ; troisième mélange, 10 UA/cm<sup>3</sup>. Nous rappelons à ce sujet que R. Prigge et E. W. Clauberg et F. Sartorius n'avaient obtenu en moyenne que 1 UA/cm<sup>3</sup> lors de leurs essais de vaccination avec d'autres vaccins.

#### CONCLUSIONS.

Il résulte de ces essais de vaccination, ainsi que de ceux publiés par l'un de nous dans un travail antérieur, les faits suivants :

1° La vaccination contre la dysenterie bacillaire peut être effectuée chez l'homme sans grands inconvénients, en remplaçant la voie sous-cutanée *par la voie intramusculaire* et en tenant compte des indications données dans le présent travail.

2° Pour obtenir une immunité efficace, il faut utiliser un vaccin polyvalent anti-Shiga-a.groupe Flexner qui contienne une quantité de toxine protéique et glucido-lipidique polypeptidique (du bacille de Shiga-Kruse) de plus de 15 d.l.m. souris pour 1 cm<sup>3</sup>. Ce vaccin contenant une si grande quantité de toxine est bien toléré par l'homme, tant au point de vue des réactions générales que locales.

3° Il faudrait pratiquer l'immunisation par trois injections, surtout chez les hommes qui accomplissent de lourds travaux ou sont nettement sous-alimentés. La vaccination à deux inoculations n'a donné de bons résultats que dans 52 à 65 p. 100 des cas, chez des hommes fatigués et mal nourris ; par contre, la vaccination à trois inoculations a donné 100 p. 100 d'immunisations chez des hommes alités et bien nourris.

4° La réaction intradermique à toxine protéique Shiga peut être utilisée pour séparer les personnes immunisées de celles qui ne le sont pas ; ces dernières doivent continuer l'immunisation.

5° Le vaccin préparé d'après notre méthode, étant d'une innocuité parfaite *par voie intramusculaire*, pourrait être utilisé avec succès dans la prophylaxie de la dysenterie bacillaire.

# SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(*Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15<sup>e</sup>.*)

Séance du 4 Novembre 1948.

Présidence de M. MAGROU.

---

## NÉCROLOGIE

### PIERRE-ERNEST PINOY

(1873-1948)

---

Une cruelle fatalité veut que, depuis la rentrée d'octobre chacune de nos séances commence par une notice nécrologique. Après avoir déploré, le mois dernier, la perte d'Etienne Sergent, notre Société est frappée à nouveau en la personne d'un éminent pastorien, Pierre-Ernest Pinoy, qui, lui aussi, a accompli une grande partie de sa carrière scientifique en Afrique du Nord.

Ernest Pinoy est né à Paris, le 3 février 1873. Après ses études classiques au Lycé eCharlemagne, il devint, en 1893, licencié ès-sciences physiques et, l'année suivante, licencié ès sciences naturelles. De 1897 à 1900, il fut préparateur du professeur Cornil à la Faculté de Médecine et acquit dans son laboratoire une connaissance approfondie de l'anatomie pathologique. Docteur en médecine en 1899, avec une thèse sur « La glande sous-maxillaire et la tuberculose », il entra en 1901 à l'Institut Pasteur, dans le laboratoire du regretté professeur Borrel, et ne tarda pas à être chargé, dans le cours de Microbiologie générale, de l'enseignement de la Mycologie. Il prit le grade de docteur ès sciences en seignement de la Mycologie. Il prit le grade de docteur ès-sciences en développement de certains Myxomycètes ».

Au moment de l'entrée de Pinoy à l'Institut Pasteur, la théorie phagocytaire de l'immunité, développée par Metchnikoff, était en plein triomphe, et l'étude des phénomènes de phagocytose était à l'ordre du jour. Il était intéressant de les rechercher chez des organismes tels que les Myxomycètes, qui se nourrissent de bactéries, et Pinoy se consacra à l'étude de ce groupe. Les Myxomycètes sont des êtres très singuliers, dont on ne sait au juste s'ils sont des végétaux, voisins des champignons, ou des animaux se rattachant aux Protozoaires du groupe des Rhizopodes.



Ils se présentent, à l'état végétatif, sous forme de masses protoplasmiques multinucléées ou plasmodes, qui peuvent atteindre de grandes dimensions et qui rampent à la surface de substratums tels que des branches pourries. Ils développent des fructifications généralement formées d'un pied que surmonte un sporange renfermant des spores. La spore germe en une zoospore ciliée qui, par perte de son flagelle, se transforme en une cellule rampante semblable à une amibe, la myxamibe. Les plasmodes se forment par fusion de nombreuses myxamibes et le cycle se trouve ainsi fermé. Les Myxomycètes sont associés à de nombreux microorganismes, bactéries et champignons. Pinoy a mis en évidence la grande importance que peut prendre l'association des bactéries dans la biologie de ces organismes. Il a réussi à obtenir des cultures pures mixtes où le plasmode du Myxomycète est associé à une seule espèce bactérienne. Dans ces conditions, il a constaté que les myxamibes ingèrent les bactéries et les digèrent dans leurs vacuoles, à l'aide d'une diastase agissant en milieu alcalin, neutre ou légèrement acide, voisine de l'amibio-diastase. Pour réaliser ses expériences, Pinoy ajoutait à des cultures de plasmodes, purifiées par passages successifs sur des milieux de culture peu favorables aux bactéries, diverses bactéries en culture pure. Le bacille tuberculeux n'est pas digéré par le Myxomycète. Les bacilles paratuberculeux, au contraire, permettent le développement. Le colibacille convient bien, et avec lui, le Myxomycète donne d'abondantes fructifications. Le *B. typhique*, au contraire, n'a pas permis le développement. Le pigment des bactéries colore souvent les plasmodes.

Enfin, Pinoy a découvert, chez les Myxomycètes, le phénomène de la sexualité hétérothallique ; il s'est comporté là en précurseur, puisque ce processus a été retrouvé par la suite dans d'autres groupes de Champignons (Basidiomycètes, Ascomycètes).

Les recherches de Pinoy sur les Myxobactéries ne sont pas moins remarquables. En culture pure, les Myxobactéries ne se distinguent en rien des bactéries les plus banales. Mais dans certaines conditions, elles édifient des appareils complexes qui, chez le *Chondromyces crocatus*, une des espèces les plus évoluées du groupe, sont formés d'un pied ramifié, portant, à l'extrémité de ses rameaux, des têtes sphériques sur lesquelles s'insèrent régulièrement des kystes ovoïdes. En dépit de leur forme compliquée, ces productions ont une structure très simple : elles sont constituées par des éléments bactériens disposés en alignements réguliers, enrobés dans une substance unissante de consistance dure et de couleur jaune orangé vif. Pinoy a montré que la condition *sine qua non* de l'apparition de ces appareils, dits de fructification, est que le *Chondromyces* soit associé à une bactérie voisine du *Micrococcus luteus*. Si l'on ensemence sur le même milieu, simultanément, le *Chondromyces* et le *Micrococcus*, on constate que ce dernier est solubilisé par la Myxobactérie ; puis les appareils de fructification s'édifient au niveau des plages bactériolysées. Le même résultat est obtenu si l'on ajoute, à une culture pure de *Chondromyces*, un extrait chloroformique de *Micrococcus luteus*. Enfin, si l'on associe au *Chondromyces crocatus*, non plus le *M. luteus*, mais une autre bactérie (*B. fluorescens*, *B. pyocyaneus*), on obtient des formes anormales dont la plus intéressante, avec ses kystes disposés en chapelet, se rapproche beaucoup du *Chondromyces catenulatus*. On assiste là, sous l'influence d'une condition parfaitement

déterminée, à la transformation d'une espèce en une autre. Découverte d'une portée considérable, capable peut-être d'apporter des clartés nouvelles dans le problème de l'Evolution, qui n'a pas eu en son temps le retentissement qu'elle méritait (Pinoy ignorant totalement l'art de se faire valoir), mais que l'avenir, sans nul doute, remettra à sa vraie place.

Dans un autre domaine, celui des mycoses ou maladies humaines et animales provoquées par les champignons, Pinoy s'est comporté en pionnier. Il était bien préparé à cette tâche par sa triple éducation de mycologue, de médecin et d'anatomo-pathologiste. Aussi multiplia-t-il les découvertes dans cette voie, décrivant des espèces nouvelles de champignons pathogènes. Mais il s'appliquait avant tout à élucider la pathogénie des mycoses ; grâce à des expériences ingénieuses, il réussit, le premier, à reproduire expérimentalement des maladies telles que les mycétomes, rebelles jusque-là à toutes les tentatives d'inoculation, en réalisant chez l'animal d'expérience les conditions qui se montraient favorables à l'éclosion de la maladie spontanée.

Pendant la guerre de 1914, Pinoy travailla activement pour la défense nationale et imagina un procédé de lipovaccination contre les fièvres typhoïdes, qui, grâce à la lenteur de la diffusion du vaccin en suspension dans un excipient gras, permettait de réduire le nombre des inoculations. En 1917, bien que dégagé, en raison de son état de santé, de toute obligation militaire, il contracta un engagement volontaire et fut affecté au Maroc, où il reçut la croix de la Légion d'honneur à titre militaire. Il devait dès lors rester fixé en Afrique du Nord. En 1922, il fut nommé Maître de Conférences, puis professeur sans chaire de Botanique à la Faculté des Sciences d'Alger. En 1925, il devint professeur de Parasitologie et de Microbiologie à la Faculté de Médecine de la même ville. Les obligations professionnelles et l'âge ne ralentirent en rien son activité ; tout récemment, avec M. Marchal, il élucidait, à l'aide de techniques de micromanipulation, le cycle évolutif d'un très curieux protiste, *l'Endococcus moriformis*.

Par son œuvre si variée et si originale, Pinoy, malgré son extrême modestie, s'était acquis une juste notoriété. Il fut deux fois lauréat de l'Institut. De 1914 à 1917, il présida la Société Mycologique de France. Membre correspondant de l'Académie de Médecine, il fut élu, en 1946, correspondant de l'Académie des Sciences pour la Section de Botanique.

Tous ceux d'entre nous qui ont connu Ernest Pinoy garderont le souvenir de l'aménité de son caractère, de son inaltérable bonne humeur, de son large sourire, de son esprit incisif et du regard pénétrant de son œil clair, apte à percer les mystères qui restent cachés aux observateurs ordinaires. Il était doué d'un tempérament d'artiste ; organiste et compositeur de talent, il avait écrit des fugues et s'était lié avec le grand maître Louis Vierne, qui lui confiait parfois le grand orgue de Notre-Dame de Paris, instrument admirable dont il était le titulaire.

J'éprouvai une grande joie, quand Pinoy, atteint par la retraite, eut décidé de reprendre sa place dans ce laboratoire de Mycologie de l'Institut Pasteur, qu'il avait fondé et où j'ai l'honneur de lui succéder. Hélas ! cette joie devait être de courte durée. C'est au laboratoire même, où il venait à peine de réparaître, qu'il ressentit les premières atteintes du mal qui devait nous l'enlever si brusquement. C'est un douloureux devoir qui m'incombe, d'avoir à adresser un dernier adieu à cet ami

si cher, qui fut pour moi le meilleur des maîtres. Que Madame Pinoy et ses enfants veuillent bien trouver ici l'expression de notre sympathie la plus vive et la plus respectueuse.

J. MAGROU.

## COMMUNICATIONS

### COLORATION DES CORPS CHROMATIQUES DES ENTEROBACTÉRIACÉES PAR UN COLORANT NEUTRE SANS HYDROLYSE PRÉALABLE

par MICHEL PIECHAUD.

La technique décrite permet, sans hydrolyse préalable, de mettre en évidence par un colorant neutre les corps chromatiques des Entérobactériacées. Les premiers travaux des auteurs utilisant la réaction de Feulgen appliquée à un matériel convenable, avaient apporté des preuves convaincantes de l'existence d'une chromatine organisée chez les bactéries, mais les images obtenues ne permettaient pas une étude morphologique précise (Stille, Delaporte, Piekarski et Knaysi). Robinow, par une méthode dérivée de la réaction de Feulgen, mais utilisant après hydrolyse un colorant basique ou le Giemsa, a précisé une technique sûre dont Mirski a proposé une explication chimique.

On admet que la basophilie intense du cytoplasme bactérien masque les corps chromatiques (Dubos, Robinow) ; cependant Badian colorait au Giemsa et différenciait par l'éosine à 1 p. 100. Neumann, Klieneberger-Nobel obtiennent dans certains cas favorables de bonnes colorations par le Giemsa. Dans un article récent Prévôt et Raynaud rappellent que différents auteurs, Hallé, Rist, Guillemot et récemment Smith, avaient coloré des corps chromatiques dans *Spherophorus funduliformis*. Minck reconnaît que ce même *Spherophorus* sans aucun traitement enzymatique montre « nettement des noyaux en tous points identiques à ceux que l'on observe après ribonucléase ».

L'emploi d'un colorant neutre sans traitement préalable évite les inconvénients d'une hydrolyse qui altère au moins le cytoplasme et évite aussi des manipulations qui compliquent la technique. La composition du colorant est d'une grande importance. Nous utilisons un éosinate d'azur I ou bien d'azur ou de violet de méthylène à l'ammoniaque préparé suivant le deuxième procédé de Tribondeau. On obtient le précipité d'éosinate par mélange en proportions convenables de solutions aqueuses d'azur ou de violet à 1 p. 100 et d'éosine à 2 p. 1.000. Après lavage le précipité est dissous dans l'alcool méthylique glyceriné à 20 p. 100. Le colorant est dilué au moment de l'emploi à raison de XXX à XL gouttes pour 20 cm<sup>3</sup> d'eau du robinet additionnée de I goutte de bleu de méthylène à 10 p. 100 en solution alcoolique.



Voici la technique que nous utilisons :

Des géloses coulées en boîtes de Petri sont ensemencées à partir d'une culture en milieu liquide et mises à l'étuve à 37° le temps voulu. Les préparations doivent être le plus mince possible ; c'est pourquoi, si avec les cultures jeunes nous procédons par apposition, avec les cultures plus âgées nous préférons faire un étalement (on découpe une étroite bande de gélose à l'aide d'un scalpel qui sert ensuite à la prélever, à l'appliquer sur la face inférieure de la lame et à la faire glisser jusqu'à son extrémité). La préparation est fixée encore humide aux vapeurs d'acide osmique pendant vingt à trente secondes, puis à l'alcool absolu. Elle est ensuite plongée quelques minutes dans de l'eau du robinet (pH 7,8), puis dans une boîte de Laveran contenant le colorant. Au bout de deux à quatre minutes, la lame est lavée rapidement à l'eau et séchée.

Récemment nous avons appliqué cette technique à quelques germes appartenant au genre *Bacillus*. Pour obtenir de bons résultats, nous avons dû acidifier l'eau de lavage à pH 6,8 (pH ajusté avec quelques gouttes d'acide chlorhydrique N/1 et vérifié au bleu de bromothymol).

La technique décrite évite l'hydrolyse qui semble inutile, du moins pour les Entérobactériacées et certains *Bacillus*, si l'on utilise un colorant approprié. Dans nos premiers essais nous nous servions de Giemsa, mais l'irrégularité des préparations et l'inconstance des résultats (variant avec les échantillons de colorant) nous ont montré la nécessité de préparer nous-même un éosinate. Le procédé utilisé a aussi l'avantage d'être simple et de montrer que les affinités tinctoriales des bactéries sont comparables à celles des autres cellules. Nous avons fait des colorations sans hydrolyse et après hydrolyse ; dans les 2 cas, les corps chromatiques rouge rubis ont des formes semblables, mais par notre technique un protoplasme bien coloré en bleu contraste avec les figures nucléaires.

(Service de Microbiologie générale de l'Institut Pasteur.)

#### BIBLIOGRAPHIE

- BADIAN. *Arch. Mikr.*, 1933, **4**, 409.  
 DELAPORTE (B.). *C. R. Acad. Sci.*, 1936, **203**, 199 ; *Rev. gén. Bot.*, 1939, **51**, 615, 689, 748 et **52**, 160.  
 DUBOS (R. J.). *The Bacterial Cell*, Harvard University Press, 1947.  
 KLIENEBERGER-NOBEL. *J. gen. Microb.*, 1947, **1**, n° 1.  
 KNAYSI (G.). *Botanical Rev.*, 1938, **4**, 83 ; *J. Bact.*, 1942, **43**, 365.  
 MINCK (R.) et MINCK (A.). *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 531.  
 MIRSKY (A.). *Adv. in Enzymology*, 1943, **3**, 1.  
 NEUMANN (F.). *Zentralbl. f. Bakt.*, 1941, **II**, **103**, 385.  
 PIEKARSKI (G.). *Arch. Mikrob.*, 1937, **8**, 428.  
 PRÉVOT (A.-R.) et RAYNAUD (M.). *Ces Annales*, 1947, **74**, 334.  
 ROBINOW (C.F.). *Proc. Roy. Soc. London B.*, 1942, **130**, 299 ; *J. Hyg.*, 1944, **43**, 413 ; Addendum *The Bacterial Cell*, DUBOS.  
 SMITH (W. E.). *J. Bact.*, 1944, **47**, 417.  
 STILLE (B.). *Arch. Mikrob.*, 1937, **8**, 125.  
 TRIBONDEAU. *Ces Annales*, 1917, **31**, 412.



**TITRAGE DE LA SENSIBILITÉ  
DES GERMES AÉROBIES AUX ANTIBIOTIQUES  
PAR LA MÉTHODE DE LA CUPULE EN GÉLOSE  
COURBES DE CONCORDANCE POUR LA PÉNICILLINE  
ET LA STREPTOMYCINE  
AVEC LA MÉTHODE DES DILUTIONS SÉRIÉES**

par Y. CHABBERT.

Le principe de ce titrage de la sensibilité des germes aux antibiotiques est très simple : une solution standard disposée dans une cupule creusée dans la gélose d'une boîte de Petri détermine en diffusant une concentration inversement proportionnelle à la distance de la source. Le diamètre de la zone d'inhibition du germe ensemencé correspond donc à sa sensibilité.

Garrod et Sureau, en ont fait une application pour le dépistage des souches pénicillino-résistantes dans un produit pathologique polymicrobien et obtiennent ainsi une évaluation qualitative de la sensibilité des germes contenus dans l'inoculum.

Nous avons repris cette technique en tenant compte de certains facteurs susceptibles d'influer sur les résultats.

*Technique* : 1° couler 25 cm<sup>3</sup> de milieu gélosé à 2 p. 100 dans une boîte de Petri de 9 cm. de diamètre. La profondeur de 4 mm. obtenue donne les résultats les plus constants.

2° Etaler sur toute la surface 1 goutte du produit pathologique dilué, de façon à obtenir des colonies suffisamment isolées pour être observées et éventuellement repiquées, et suffisamment denses pour que les cercles d'inhibition soient nets.

3° Découper dans la gélose avec un perforateur de 10 mm. de diamètre, 4 cupules disposées à 1,5 cm. de la périphérie.

4° Remplir chacune de ces cupules avec 0,20 cm<sup>3</sup> de solution d'antibiotique aux concentrations suivantes :

Pénicilline, 10 et 1 unité par centimètre cube.

Streptomycine, 1.000 et 100  $\gamma$  par centimètre cube.

5° Fermer les boîtes en intercalant un disque de papier filtre pour absorber l'eau de condensation et porter à l'étuve à 37° pendant vingt-quatre heures.

En opérant dans ces conditions, les diamètres des cercles d'inhibition correspondant aux différents types de colonies fournissent non plus un résultat qualitatif, mais une mesure suffisamment précise des sensibilités. Il est alors possible, en utilisant des souches de sensibilités très différentes de les titrer vis-à-vis d'un antibiotique à la fois par cette technique et par la méthode classique des dilutions sériées. On a ainsi une courbe de concordance entre les deux méthodes qui permet de traduire le diamètre en taux de sensibilité exprimé en unités par centimètre cube. Ce taux présente un grand intérêt, car il est comparable aux concentrations en antibiotique obtenu dans les humeurs et permet de guider la thérapeutique.

*Courbes de concordance.* — L'allure générale des courbes a été obtenue avec 50 souches de *Staphylocoques*, *Streptocoques* et *Neisseria* pour la

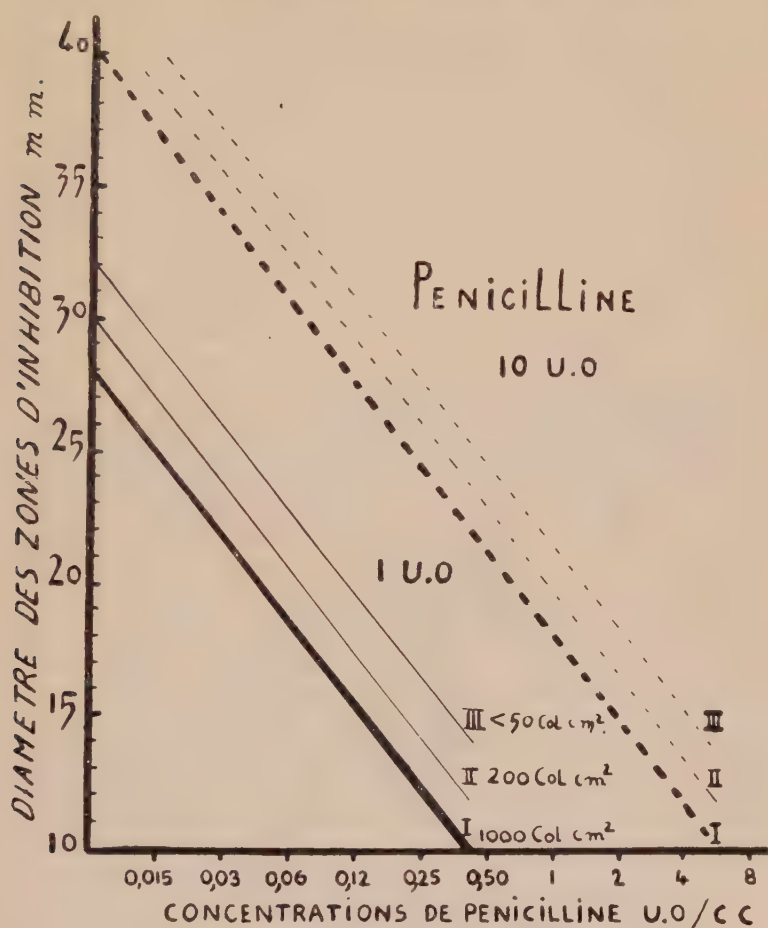


FIG. 4.

pénicilline, et 85 souches de cocci et d'entérobactéries pour la streptomycine. Puis certains points ont été précisés en étudiant les diamètres et taux de sensibilité moyens donnés par quelques souches de sensibilités très étagées.

Mais les diamètres varient aussi avec un facteur qu'il est difficile de contrôler au moment de l'ensemencement : la densité des colonies sur la gélose. On est donc obligé d'établir pour une seule valeur de l'antibiotique, une série de courbes correspondant à plusieurs densités d'inoculum observables :

I. Colonies presque confluentes, au-dessus de 500 colonies par centimètre carré.

II. Colonies denses mais séparées, environ 200 colonies par centimètre carré.

III. Colonies nettement isolées, moins de 50 colonies par centimètre carré.

Pour plus de clarté, les abscisses des courbes suivent la progression

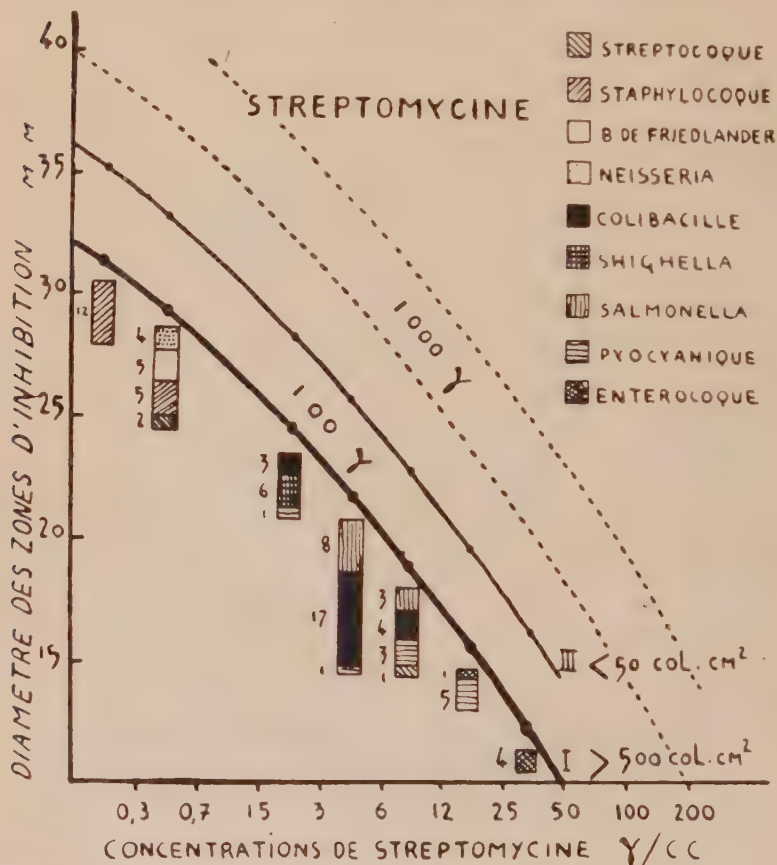


FIG. 2.

géométrique de la gamme des concentrations réalisées dans la méthode des dilutions sériées.

*Pénicilline :*

Avec 1 ou 10 unités, on obtient des droites sensiblement parallèles et séparées par 12 mm. Avec la concentration de 1 unité par centimètre cube, il est possible d'établir la sensibilité des germes allant de 0,40 à 0,01, ce qui correspond à l'étendue habituelle de la zone de pénicillinémie.

*Streptomycine :*

L'allure de la courbe n'est pas la même. La différence entre 100 et 1.000  $\gamma$  est en moyenne de 8 mm. ; comme précédemment, la concentration de 100  $\gamma$  par centimètre cube permet de titrer les souches comprises entre 50  $\gamma$  et 0,10  $\gamma$ , ce qui constitue la zone de streptomycinémie.

*Précision.* — La précision est différente selon qu'on applique la méthode à des souches pures ou à des produits pathologiques.

Avec des souches pures :

Pour la pénicilline :

Ecart maximum $\pm$ 3,7 mm. . . . .	15 p. 100
Ecart moyen $\pm$ 1 mm. . . . .	5 —

Pour la streptomycine :

Ecart maximum $\pm$ 2,7 mm. . . . .	10 p. 100
Ecart moyen. $\pm$ 1,4 mm. . . . .	5 —

L'observation des courbes montre que l'écart entre deux tubes dans la méthode de dilutions équivaut à des variations de diamètre des cercles d'inhibition de 4 mm. pour la pénicilline et de 1,8 à 3,6 pour la streptomycine. La précision serait donc supérieure ici à celle de la méthode de dilutions.

Avec les produits pathologiques, en raison des difficultés de lecture, la précision est moindre. L'erreur moyenne est de 20 p. 100. La concordance reste cependant suffisante pour les besoins de la clinique.

Cette technique réalise la mesure de la sensibilité des germes contenus dans un produit pathologique vis-à-vis de plusieurs antibiotiques sans isolement préalable donc très rapidement.

De plus, elle permet le titrage des germes difficiles à cultiver dans des conditions satisfaisantes pour un test en milieu liquide. Enfin elle rend possible la différenciation dans un produit pathologique de souches d'une même espèce microbienne très voisines au point de vue morphologique et culturel qui présentent cependant des taux de sensibilité différents. Il s'agit donc d'une technique de valeur clinique certaine capable de rendre de grands services dans la thérapeutique par les antibiotiques.

(Travail de Laboratoire de Microbiologie générale  
de l'Institut Pasteur.)



**ACTIONS ANTAGONISTES DE L'ACTINOMYCÈTE 105  
SUR QUELQUES MICROORGANISMES  
POUR LA PLUPART PHYTO-PATHOGÈNES  
ESSAIS D'APPLICATION  
DANS LA LUTTE CONTRE LES MALADIES DES PLANTES**

par H. DARPOUX et A. FAIVRE-AMIOT.

Nous avons isolé du sol un Actinomycète, désigné provisoirement sous le n° 105, qui est doué de propriétés bactériolytiques remarquables (1) et a une action inhibitrice très nette sur le développement de nombreux champignons.

*Propriétés bactériolytiques de l'Actinomycète 105.* — Ces propriétés ont été mises en évidence, en boîte de Petri, sur gélose pomme de terre glucosée ou gélose peptone, par l'apparition d'une zone de lyse autour des colonies de l'Actinomycète.

La lyse est particulièrement nette sur le *Pseudomonas tabaci*, agent du « Feu sauvage » du Tabac ; le *Pseudomonas mori*, agent de la « Gommose bacillaire » du Mûrier ; le *Xanthomonas campestris*, agent de la « Nervation noire » des Crucifères ; le *Pseudomonas medicaginis*, agent d'une nécrose de la tige de la Luzerne ; le *Pseudomonas phaseolicola*, agent d'une maladie du Haricot ; l'*Erwinia phytophthora*, agent de la « jambe noire » de la Pomme de Terre ; le *Bacillus alvei*, agent d'une maladie des couvains d'abeilles, ainsi que sur le *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*, l'*Escherichia coli* et le *Bacillus subtilis*.

Elle est moins constante sur le *Pseudomonas xanthochlora*, agent d'une pourriture humide chez diverses plantes. Elle est très faible et inconstante sur l'*Agrobacterium tumefaciens*, agent du « Cancer végétal ».

Pour le *Pseudomonas tabaci*, dans un cas nous avons obtenu la lyse complète du voile bactérien couvrant la surface d'un milieu à base de gélose pomme de terre glucosée, dans une boîte de Petri de 9 cm. de diamètre, douze à dix-huit jours après l'ensemencement de 10 colonies de l'Actinomycète. Dans d'autres cas, la zone de lyse apparaît après vingt-quatre heures, mais reste ensuite limitée à une auréole de 0,5 cm. à 2 cm. de large.

Pour le *Pseudomonas mori*, le *Pseudomonas medicaginis* et le *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*, on constate au début une action stimulante des produits sécrétés par l'Actinomycète, à laquelle succède brusquement l'action de lyse.

L'Actinomycète 105 a aussi une action très nette sur les bactéries cultivées sur le milieu liquide suivant : peptone, 20 g. ; glucose, 2 g. ; NaCl, 5 g. ; eau, 1 litre. Ce milieu reste limpide si on l'ensemence en même temps par l'Actinomycète 105 et par le *Pseudomonas tabaci* ou

(1) H. DARPOUX et A. FAIVRE-AMIOT, *C. R. Acad. Sci.*, 1948, 226, 1046.

le *Pseudomonas mori* ou le *Bacillus alvei*, tandis que les bactéries ensemencées seules provoquent un trouble.

D'autre part, nous avons obtenu un précipité des bactéries et la clarification du milieu en ensemencant l'Actinomycète 105 dans des cultures de *Pseudomonas tabaci* âgées de vingt-quatre heures, de trente-six heures et de cinquante-quatre heures.

Dans des essais préliminaires, un jus de culture de l'Actinomycète 105, à base de pomme de terre glucosée, filtré sur une bougie de porcelaine L7, a eu une action inhibitrice, à la concentration de 1/20, sur le développement de diverses bactéries et, en particulier, sur le *Bacillus alvei*.

*Propriétés inhibitrices de l'Actinomycète 105 sur le développement des champignons.* — En boîte de Petri, sur gélose pomme de terre glucosée, le mycélium de certains champignons ne se développe pas ou peu en direction des colonies de l'Actinomycète 105.

L'action inhibitrice est très nette dans le cas de l'*Endothia parasitica*, isolé d'un chancre du Châtaignier ; du *Monilia cinerea* (*Sclerotinia cinerea*), isolé du Prunier et du Cerisier. Elle est nette sur le *Sclerotinia libertiana* (souches isolées de la Carotte et du Tournesol) ; sur le *Dendryphium penicillatum* (*Pyrenophora calvescens*), isolé de l'Oeillette ; sur l'*Alternaria brassicae*, isolé du Crambe, et sur le *Trichothecium roseum*. Elle est faible, mais constante, sur le *Monilia fructigena* (*Sclerotinia fructigena*), souches isolées d'une pomme et d'une poire ; sur un *Botrytis* sp. (n° 1062), isolé du sol, et sur un *Pestalozzia* sp., isolé d'un rameau dépérissant de Cerisier. Elle est faible et inconstante sur un *Rhizoctonia* sp., sur le *Phytophthora cinnamoni*, isolé du Châtaigner, et sur l'*Ascochyta pisi*.

Il n'y a pas eu d'inhibition, dans les conditions de l'expérience, sur le *Rhacodiella Castaneae* (*Sclerotinia pseudo-tuberosa*), isolé d'une châtaigne ; sur un *Botrytis* sp., isolé d'une carotte ; sur un *Sclerotium* sp., isolé d'une pomme de terre ; sur le *Rhizoctonia solani* ; sur le *Pythium De Baryanum*, et sur le *Sclerotium rolfsii*.

*Essai d'application dans la lutte contre les maladies des plantes.* — *Première expérience.* — Des graines de Tabac, inoculées par le *Phytophthora tabaci*, ont été semées en pot sur de la terre stérilisée, un premier lot directement, un second lot après avoir trempé plusieurs heures dans le liquide non filtré du milieu de culture de l'Actinomycète 105. Dans le premier lot, toutes les plantules furent atteintes par la « Fonte des Semis » et disparurent environ trois semaines après la levée. Dans le lot traité, au contraire, les plantules furent indemnes et, actuellement, elles sont encore toutes vivantes six mois après le semis.

*Deuxième expérience.* — Des graines de Tournesol décortiquées, puis désinfectées par la chaleur, ont été mises à germer sur du coton humide dans des flacons d'Erlenmeyer. Dans chacun des flacons, nous avons déposé un fragment de gélose d'une culture de *Sclerotinia libertiana*, puis dans quatre de ces flacons, nous avons versé quelques centimètres cubes du liquide non filtré du milieu de culture de l'Actinomycète 105, tandis que les autres flacons servaient de témoins. Toutes les plantules des flacons témoins furent envahies et tuées par le Champignon, huit jours plus tard. Par contre, il ne s'est produit aucune

attaque dans les flacons ayant reçu du jus de culture de l'actinomycète. Actuellement, les plantules de ces flacons, âgées d'un mois, sont toujours indemnes.

*Troisième expérience.* — De la terre infectée naturellement par des organismes provoquant des flétrissements du Melon, mise en pots, a été arrosée avec du liquide non filtré du milieu de culture de l'Actinomycète 105, puis ensemencée par des graines de Melon. Sur les 20 graines semées, 12 donnèrent des plantules qui sont actuellement âgées d'un mois et sont indemnes de maladies, tandis que sur de la terre non traitée, un lot de 20 graines ne donna que 6 plantules dont 4 furent atteintes de flétrissement le vingtième jour.

Ici aussi, l'Actinomycète semble s'être montré actif, mais l'expérience devra être reprise sur une plus grande échelle.

*Conclusions.* — Ces résultats permettent d'espérer qu'il sera possible d'utiliser les propriétés de l'Actinomycète 105 pour prévenir certaines maladies par le traitement des semences et pour diminuer la virulence d'agents pathogènes se conservant dans le sol, en particulier du *Sclerotinia libertiana*.

D'autre part, on sait, en horticulture, que la désinfection du sol par la chaleur est parfois néfaste. En effet, si un agent pathogène vient par la suite s'installer en premier dans le sol, il ne rencontrera pas d'ennemis naturels et pourra pulluler. Il semble donc intéressant d'apporter au sol, après une telle désinfection, un mélange de microorganismes saprophytes judicieusement choisis par leurs propriétés antagonistes. L'Actinomycète 105 pourrait être un de ceux-là.

(Travail effectué

à la Station Centrale de Pathologie Végétale, Versailles.)

## RECHERCHES BIOCHIMIQUES SUR *TREPONEMA MICRODENTUM*

par A. R. PRÉVOT et R. VINZENT.

Les difficultés de culture des spirochètes anaérobies avaient jusqu'ici empêché toute investigation sur leur métabolisme : produits terminaux de fermentation et type fermentaire. La mise au point d'un milieu liquide permettant la culture facile de l'un d'eux : *Treponema microdentum* Noguchi, nous a permis de réaliser cette étude.

Voici comment on prépare ce milieu :

On fait macérer pendant vingt-quatre heures le mélange suivant :

Viande de bœuf hachée . . . . .	500 g.
Reins de porc hachés . . . . .	Deux.
Eau distillée. . . . .	2 litres.

On porte à l'ébullition, on filtre à chaud, et on ajoute :

NaCl . . . . .	10 g.
Gélatine . . . . .	20 g.
Peptone pepsique. . . . .	10 g.

On neutralise à pH 7,6, on précipite à 115° C, on filtre, on vérifie le pH, on répartit en flacons fermés qui sont stérilisés à 112°.

La souche « Mad » (1) utilisée provient d'un pus de pyorrhée alvéolaire. Après trois à cinq jours d'étuve à 37°, la culture est centrifugée et le liquide clair sert à la recherche des produits de métabolisme suivant la méthode qui, depuis dix ans, a permis de mettre en évidence le type fermentaire de nombreuses espèces anaérobies. Parallèlement, nous avons fait subir au milieu non ensemencé la même étude de façon à voir si les corps décelés après culture n'y préexistaient pas.

Dans le premier distillat, après alcalinisation à pH 8,2, du liquide clair de centrifugation, nous avons décelé une quantité importante d'indol, d' $\text{SH}_2$  et 0,0612 g. p. 100 d' $\text{HN}_3$ . Mais il n'y avait ni amine volatile, ni cétone, ni acétylméthylcarbinol, ni alcool, ni crésol, ni phénol, ni scatol. Après entraînement des acides volatils à la vapeur, nous avons vu que l'acidité volatile atteignait 0,582 g. p. 100 ; c'est dire qu'elle y était très élevée ; elle consiste en acide acétique presque pur (avec traces d'acide formique et d'un acide supérieur, probablement butyrique).

Il n'y avait après libération suivie d'extraction à l'éther, aucun acide fixe dans la culture. Dans le milieu stérile non ensemencé, nous avons trouvé une petite quantité d' $\text{NH}_3$  : 0,0136 g. p. 100, ce qui permet de dire que la quantité réellement produite par le microbe est de 0,0476 g. Nous avons également trouvé une très faible acidité volatile, 0,001 g. p. 100. Or, cette acidité initiale consiste autant qu'il est possible de le dire, étant donné sa faible teneur, en traces d'acide formique et d'un acide supérieur, probablement butyrique. Ce sont ces traces qu'on retrouve après culture, de sorte que *Treponema microdentium* serait un ferment acétique pur, ce qui, d'après les statistiques du Service des Anaérobies ne se rencontre que dans 3 p. 100 des espèces étudiées (2).

*Conclusions.* — Cette première étude biochimique sur les spirochètes anaérobies permet de dire que *Treponema microdentium* :

1° Possède une désaminase relativement peu active, dont le substratum reste à trouver.

2° Sépare activement l'indol du tryptophane.

3° Désulphydrile les composés organiques sulphydrilés.

4° Est un ferment acétique pur très actif.

Ces données sont une première vue du mécanisme d'action de cette espèce sur les milieux artificiels et pourront servir de base à son diagnostic différentiel quand on aura trouvé le moyen d'appliquer la même étude aux autres espèces du genre *Treponema*.

(Institut Pasteur : Services des Anaérobies  
et Laboratoire des Hospices Civils du Havre.)

(1) Souche isolée par P. SEGUIN.

(2) PRÉVOT et TAFFANEL, *Ann. Ferment*, 1942, 7, 65.



## DIFFICULTÉS RENCONTRÉES DANS LE DIAGNOSTIC DE LA MAMMITE STREPTOCOCCIQUE CONTAGIEUSE DES VACHES LAITIÈRES

par L. COTONI, P. FORGEOT ET G. THIEULIN.

Des recherches anciennes sur les divers streptocoques nous ont conduits à étudier depuis plusieurs années la mammite streptococcique des vaches laitières. L'importance économique de cette affection de nature chronique est connue dans le monde entier. Les chiffres suivants suffisent à donner une idée des pertes que cause la maladie. Stableforth (1) a estimé la perte annuelle en lait de vache subie, du fait de la mammite contagieuse, en Angleterre et au Pays de Galles réunis, à 3.240.000 livres sterling. Le Dr Steiger (2), Ministre de l'Agriculture, parlant en 1941, devant une commission du Landtag prussien, au cours de la discussion du budget de l'Agriculture, évaluait, d'après une estimation prudente, les dommages imputables à la mammite streptococcique, à 250.000.000 de marks-or par an.

La lecture de nombreux travaux sur le traitement, impose la notion de l'efficacité restreinte des diverses méthodes thérapeutiques proposées. Ne se heurte-t-on pas souvent au caractère invétéré des lésions ? La solution du problème ne résiderait-elle pas dans l'établissement d'un diagnostic très précoce, à une époque où les signes cliniques, obscurs, incertains, absents même, ne permettent pas de reconnaître la mammite ? Il n'est pas défendu d'espérer qu'on pourrait, à cette époque-là, agir efficacement, grâce à la chimiothérapie, et arrêter l'éclosion d'épidémies par un sévère isolement des animaux reconnus infectés. Aujourd'hui, l'observation soigneuse des vaches d'une étable, la pratique des traites faites dans un certain ordre, répétées et totales, l'élimination des malades, semblent fournir les résultats les plus tangibles, comme l'un de nous s'est attaché, avec Beaufrière et Gély (3) à le démontrer, dans les étables de la région parisienne.

Si l'on recherche la valeur des différents procédés de diagnostic de la mammite contagieuse, il est à retenir que l'ensemencement d'un lait montrant des streptocoques à l'examen microscopique direct, a pu ne nous fournir parfois aucun développement microbien, après ensemencement (4), à plus forte raison ne saurait-on compter déceler toujours le streptocoque, lorsqu'il ne serait présent dans le lait qu'à l'état de rares unités.

Que peut-on penser maintenant de l'examen du *sang* des vaches malades pour la recherche d'anticorps antistreptococciques éventuels ?

(1) STABLEFORTH, *Proceed. Roy. Soc. Med.*, 1942, **35**, 625.

(2) STEIGER, cité par PORCHER, *Le Lait*, 1932, **42**, n° 114, 257.

(3) BEAUFRÈRE, GÉLY et THIEULIN, *Bull. Acad. Vét. France*, 1942, **45**, n° 1 ; 1943, **46**, 338 ; *Recueil Méd. Vét.*, 1946, **122**, n° 11.

(4) COTONI, FORGEOT et THIEULIN, ces *Annales*, 1946, **72**, 184.

En France, la recherche des *agglutinines* dans le sang a été proposée par Lesbouyriès et Adam [1933] (5). Mais la valeur diagnostique de ce procédé est fortement infirmée par les propriétés des streptocoques eux-mêmes, espèce bactérienne se développant souvent à l'état agglutiné dans les milieux de culture et se montrant souvent agglutinable par les sérums d'animaux même normaux ; il faudrait, pour tirer de la méthode des résultats facilement lisibles et probants, qu'on décelât un pouvoir agglutinant vis-à-vis des streptocoques, dans le sang des vaches atteintes de mammite ; or, l'expérience ne répond pas à ce souhait. D'autre part, les échantillons de streptocoque de mammite ayant été classés en Angleterre en diverses races de constitution antigénique différente [Stableforth] (6), il serait sans doute nécessaire de faire défiler les sérums de vaches devant l'échantillon microbien infectant ou un autre appartenant à la même race sérologique. Ces remarques rendent incertaine l'utilité de la méthode. D'ailleurs Minett, Stableforth, Edwards qui ont poursuivi pendant de longues années, en Grande-Bretagne, des recherches sur la mammite, ne font eux-mêmes pas mention de la possibilité d'un séro-diagnostic agglutinant.

La recherche des *précipitines* peut paraître plus tentante, puisque l'agglutinabilité particulière des streptocoques cesse ici d'être un obstacle. Il est de notion courante que le sérum des lapins traités dans les veines par des injections répétées de corps microbiens streptococciques précipite les extraits préparés suivant la méthode de Lancefield à partir des streptocoques de même groupe et le fait se vérifie pour les streptocoques de la mammite. Mais cette propriété précipitante a toujours fait défaut dans le sang des vaches malades étudié par nous. Même absence de pouvoir précipitant chez 3 échantillons de sang de vaches malades, vis-à-vis d'un extrait préparé avec des streptocoques de la mammite suivant la technique de Besredka (dessiccation des microbes et broyage avec NaCl anhydre) ; pareil extrait avait été utilisé jadis dans des recherches sur l'immunité antistreptococcique (7). Même absence encore de pouvoir précipitant du sang de vache malade vis-à-vis de deux autres extraits, que nous remercions MM. Grabar et Oudin d'avoir préparés pour nous, l'un de nature polysaccharidique, l'autre à partir de streptocoques ultrasonnés.

Des essais de détection d'antigène streptococcique dans le lait des vaches malades, au moyen de sérums antistreptococciques de lapins, ne nous ont fourni que des résultats négatifs.

Dans une direction différente, nous avons été amenés à nous demander si le sang des vaches malades possède un *pouvoir antifibrinolytique* vis-à-vis des streptocoques de la maladie. Tillett et Garner (8) ont mis autrefois en lumière le pouvoir fibrinolytique exercé sur la fibrine humaine par de nombreux échantillons de streptocoque. Ce pouvoir sur la fibrine humaine est d'ailleurs beaucoup plus répandu parmi les streptocoques humains (28 sur 28) que parmi les streptocoques animaux (3 sur 18). Dans un travail ultérieur,

(5) LESBOUYRIÈS et ADAM, *Bull. Acad. Vét. France*, 1933, 6, 61.

(6) STABLEFORTH, *J. Path. Bact.* 1937, 45, 263 ; *ibid.*, 1938, 46, 21.

(7) COTONI, CÉSARI et CHAMBRIN, *ces Annales*, 1933, 50, 608.

(8) TILLET et GARNER, *J. exp. Med.*, 1933, 58, 485.

Tillet (9) signale comme *non fibrinolytiques*, 31 échantillons de streptocoque isolés du lait et dans la mammite. D'après Tillet (10), 75 p. 100 des sujets guéris d'une infection streptococcique (scarlatine, érysipèle, amygdalite), possèdent dans le sang une antifibrinolysine. Mais la plupart des échantillons pathogènes des mammites, appartenant au groupe B de Lancefield, paraissent dénués de pouvoir hémolytique et de pouvoir fibrinolytique [Tillet] (11); aussi ne peut-on guère compter déceler régulièrement de pouvoir antifibrinolytique dans le sang de vaches malades. En fait, il nous est arrivé *une seule fois* de trouver un échantillon de sang de vache, présentant un pouvoir antifibrinolytique indiscutable vis-à-vis de la fibrine bovine; nous avons appris plus tard qu'il provenait d'une vache atteinte de *mammite confirmée*.

Il convient, ajoutons-le, de préciser à quelle espèce animale appartient la fibrine utilisée dans la réaction. Les fibrines de diverses espèces animales semblent offrir, en présence d'une fibrinolysine donnée, une sensibilité inégale. Nos recherches ont été faites avec la fibrine bovine, mais même vis-à-vis de cette dernière, le pouvoir fibrinolytique des streptocoques du lait de vache se montre inconstant. Smith, Hankinson et Mudge (12) trouvent parmi 22 échantillons de streptocoques hémolytiques de lait de vache, 9 seulement capables d'attaquer la fibrine bovine (2 de vaches saines, 7 de vaches atteintes de mammite). En résumé, il nous paraît possible que le sang de certaines vaches malades possède un pouvoir antifibrinolytique, mais on ne saurait affirmer que ce pouvoir se rencontre toujours, même quand l'échantillon microbien infectant lyse la fibrine. Comme cette propriété semble exceptionnelle parmi les streptocoques de la mammite, la méthode en question ne semble pas susceptible d'une large application.

Enfin, dans une direction encore différente, nous avons recherché si le sérum des vaches malades, ajouté aux milieux de culture, est capable de modifier les caractères du streptocoque pathogène. Du bouillon est additionné de sérum de vache malade (1/10) et ensemencé avec le streptocoque de la mammite. Après 4 passages, la culture peut se montrer plus abondante, plus agglutinée, composée de chaînettes microbiennes notablement plus longues que la culture en bouillon-sérum de vache saine. Dans ces deux séries, nous n'avons pas réussi à mettre en lumière de différences dans les colonies obtenues sur milieux solides, et ces recherches gagneraient à être étendues.

En conclusion, presque tous nos essais aboutissent à des résultats négatifs: difficultés techniques et causes d'erreur dans la recherche du pouvoir agglutinant des sérums de vaches, pouvoir précipitant nul dans les conditions présentes, pouvoir antifibrinolytique probablement exceptionnel, modifications peu caractéristiques des streptocoques cultivés en présence des sérums pathologiques. On est donc réduit à la recherche des streptocoques par ensemencement du lait, avec les incertitudes des méthodes actuelles.

(Institut Pasteur.)

(9) TILLET, *J. Bact.*, 1935, **29**, 111.

(10) TILLET, *J. clin. Invest.*, 1935, **14**, 276.

(11) TILLET, *Bact. Rev.*, 1938, **2**, 161.

(12) SMITH, HANKINSON et MUDGE, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1936, **34**, 266.



# **SURVIE *IN VITRO* DE *RICKETTSIA BURNETI* DE LA FIÈVRE Q EN ROUMANIE**

par D. COMBIESCO et NISTOR DUMITRESCO,

Dans une communication antérieure, nous avons montré que le sang des cobayes, inoculés avec la *Rickettsia* isolée chez l'homme en Roumanie, a été trouvé virulent pendant au moins soixante-deux jours après l'infection. Des expériences en cours nous montreront quelle est la persistance de cet agent infectieux dans les tissus des cobayes après la défervescence. Pour le moment, nous donnons les résultats de nos recherches sur la survie *in vitro* de cette *Rickettsia*.

La conduite de ces expériences a été la suivante :

Huit cobayes infectés avec la *Rickettsia* isolée en Roumanie ont été saignés, par ponction du cœur, le troisième ou le quatrième jour de leur maladie. Le sang ainsi recollé a été immédiatement réparti dans des tubes à hémolyse stérilisés, à raison de 2 cm<sup>3</sup> de sang par tube. Le sang, une fois coagulé, a été couvert d'une couche d'huile de vaseline stérilisée. Les tubes fermés par un bouchon d'ouate étaient gardés à la température du laboratoire jusqu'au moment où nous avons voulu savoir si le sang était encore infectant.

Au moment de l'expérience, nous nous débarrassons de l'huile de vaseline, nous broyons ensuite le coagulum de sang dans un mortier en ajoutant 1 à 2 cm<sup>3</sup> d'eau physiologique. Le broyage obtenu est inoculé dans le péritoine d'un cobaye. Un cobaye reçoit ainsi 2 à 4 cm<sup>3</sup> de sang coagulé.

Voici les résultats obtenus :

Un cobaye est inoculé avec 3 cm<sup>3</sup> de sang coagulé, sang gardé pendant deux mois dans les conditions décrites plus haut. Durant les sept premiers jours qui suivent l'inoculation, la température du cobaye reste normale. Le huitième jour au matin, la température monte à 40°5 et le soir à 40°8, pour, les jours suivants, évoluer ainsi :

9 <sup>e</sup> jour . . . . .	41°4	40°5	14 <sup>e</sup> jour . . . . .	39°5	39°6
10 <sup>e</sup> jour . . . . .	40°4	40°8	15 <sup>e</sup> jour . . . . .	40°	39°7
11 <sup>e</sup> jour . . . . .	40°9	40°9	16 <sup>e</sup> jour . . . . .	39°	39°
12 <sup>e</sup> jour . . . . .	40°5	39°8	17 <sup>e</sup> jour . . . . .	39°7	39°
13 <sup>e</sup> jour . . . . .	40°	39°8			

Un autre cobaye a été inoculé dans le péritoine avec 4 cm<sup>3</sup> de sang coagulé gardé à la température du laboratoire pendant soixante-huit jours (deux mois et huit jours). Il a réagi comme le premier cobaye. Après une incubation de huit jours, la température monta à 40° pour se maintenir les deux jours suivants à 40°2, 40°5, 40°5, lorsqu'il fut sacrifié pour des passages à deux autres cobayes. Les cobayes de passage ont réagi après une incubation de quatre à cinq jours.

Un autre cobaye fut inoculé avec 3 cm<sup>3</sup> de sang conservé gardé pen-



dant *trois mois* à la température du laboratoire. Il a réagi après une période d'incubation de sept jours ; la courbe fébrile fut presque identique à celle présentée par le premier cobaye :

7 <sup>e</sup> jour . . . . .	39°5	39°8	12 <sup>e</sup> jour . . . . .	41°	40°8
8 <sup>e</sup> jour . . . . .	39°	39°9	13 <sup>e</sup> jour . . . . .	40°6	40°6
9 <sup>e</sup> jour . . . . .	40°4	40°5	14 <sup>e</sup> jour . . . . .	40°4	39°4
10 <sup>e</sup> jour . . . . .	40°6	40°5	15 <sup>e</sup> jour . . . . .	39°5	39°6
11 <sup>e</sup> jour . . . . .	40°9	41°4	16 <sup>e</sup> jour . . . . .	38°7	38°8

Un autre cobaye, dans les mêmes conditions, avec du sang gardé pendant *trois mois* a réagi après une incubation de sept jours.

Un autre cobaye a été inoculé dans le péritoine avec 2 cm<sup>3</sup> de sang coagulé, sang gardé pendant *quatre mois et demi* sous huile de vaseline, à la température du laboratoire. Il a réagi après une incubation de neuf jours, lorsque la fièvre monte à 39°9 et les jours suivants à 40°4, 40°1, 40°4, 40°7, 40°7, 40°5, 40°5, 40°3. Il fut sacrifié pour des passages à d'autres cobayes le cinquième jour.

Un autre cobaye fut inoculé dans les mêmes conditions avec 3 cm<sup>3</sup> de sang conservé *six mois et huit jours*. Il réagit après une incubation de neuf jours et la maladie dura cinq jours.

Un autre cobaye, inoculé avec 4 cm<sup>3</sup> de sang ayant été gardé pendant *huit mois* à la température du laboratoire sous huile de vaseline, présentait une maladie fébrile des plus démonstratives, après une incubation de six jours :

6 <sup>e</sup> jour . . . . .	39°5	39°7	11 <sup>e</sup> jour . . . . .	40°6	40°8
7 <sup>e</sup> jour . . . . .	40°	40°2	12 <sup>e</sup> jour . . . . .	40°5	39°7
8 <sup>e</sup> jour . . . . .	40°3	40°8	13 <sup>e</sup> jour . . . . .	39°4	39°1
9 <sup>e</sup> jour . . . . .	40°4	41°3	14 <sup>e</sup> jour . . . . .	39°2	39°
10 <sup>e</sup> Jour . . . . .	40°8	40°8	15 <sup>e</sup> jour . . . . .	39°	39°

Un autre cobaye a reçu dans le péritoine 4 cm<sup>3</sup> de sang gardé pendant *neuf mois et dix-huit jours* à la température du laboratoire sous huile de vaseline. Il a réagi après une incubation de douze jours ; la maladie fut très courte (trois jours), avec 39°7, 39°9, 40°4, 40°6, 40°1 de fièvre.

Un cobaye inoculé avec du sang gardé pendant *onze mois* dans les mêmes conditions n'a pas réagi. Il a été observé pendant trente jours et sa réaction thermique n'a pas été caractéristique. Il a présenté seulement le dix-septième et le dix-huitième jour, 39°7, 39°6. Mais dans ce cas il y a une remarque à faire, cette fois-ci le sang n'avait pas été trouvé coagulé, il était laqué. Nous ne savons pas pourquoi, car au contrôle le sang fut trouvé stérile.

Quoi qu'il en soit, nos expériences prouvent que la souche roumaine *Rickettsia burneti*, agent infectieux de la fièvre, Q, a survécu plus de neuf mois dans le sang de cobaye, gardé à la température du laboratoire, sous une couche d'huile de vaseline.

(Travail de l'Institut de Sérologie [D<sup>r</sup> I. Cantacuzino] et du Laboratoire de Pathologie générale de la Faculté de Médecine de Bucarest.)

## DIAGNOSTIC RÉTROSPECTIF PAR LA RÉACTION DE FIXATION DU COMPLÉMENT D'UN FOYER ROUMAIN DE FIÈVRE Q

par D. COMBIESCO, CORNELIA COMBIESCO, NISTOR DUMITRESCO,  
C. POPESCO et G. ZARNEA.

L'identification d'une nouvelle rickettsiose chez l'homme, en Roumanie, à l'occasion de l'étude de la maladie constatée à Constantza (1), nous a permis d'établir le diagnostic rétrospectif (grâce à la réaction de fixation du complément) d'un nouveau foyer de fièvre Q.

Il s'agit de 9 malades qui faisaient partie du personnel de la section antirabique de l'Institut de Sérologie (D<sup>r</sup> I. Cantacuzino) de Bucarest. De ces individus, 7 tombèrent malades entre le 28 mars et le 6 avril, le huitième le 11 avril et le dernier le 23 avril.

Deux ou trois semaines avant de tomber malades, tous les sujets ont participé d'une manière quelconque à la tonte des brebis qui avaient servi à la préparation du vaccin antirabique. Ces brebis provenaient de la Dobrodgea, région où se trouve la ville de Constantza.

Le tableau symptomatique présenté par ces malades est, avec de légères variations, presque identique. Nous indiquons les données les plus importantes d'une des feuilles d'observation.

Chez le malade Ver... (N), la maladie a débuté le 28 mars 1947, avec des frissons, répétés le lendemain avec une plus grande intensité, accompagnés de céphalée, de douleur de la peau du crâne, de fièvre. Le troisième jour de la maladie survint une hypotymie, obligeant le malade à s'aliter. Cette maladie a duré onze jours. Le malade accusa tout ce temps de la céphalée, des douleurs rétro-oculaires, des transpirations, quelquefois profuses, présentant les six à sept premiers jours un léger état typhique.

Une toux légère, accompagnée d'un point de côté dans l'hémi-thorax gauche et de râles bronchiques survint le 30 mars.

Voici l'évolution de la courbe thermique chez ce malade :

29 Mars . . . . .	38°9	5 Avril . . . . .	37°7	36°5
30 Mars . . . . .	38°8	6 Avril . . . . .	38°3	36°5
31 Mars . . . . .	39°1	7 Avril . . . . .	38°	37°6
1 <sup>er</sup> Avril . . . . .	37°3	8 Avril . . . . .	36°8	36°7
2 Avril . . . . .	38°2	9 Avril . . . . .	36°5	36°5
3 Avril . . . . .	38°8	10 Avril . . . . .	36°3	36°5
4 Avril . . . . .	39°3			

Aucun malade ne présenta d'exanthème. Les examens de laboratoire ont été négatifs tant pour la fièvre récurrente, que pour le typhus exanthématique. La convalescence a été de longue durée, accompagnée d'une fatigue assez persistante.

(1) D. COMBIESCO, V. VASILIU et N. DUMITRESCO. *C. R., Soc. Biol.*, 1947, **141**, 716.

Il s'agit donc de neuf malades présentant des symptômes cliniques très semblables, mais sur lesquels on n'a pu porter un diagnostic précis.

Quelque temps après leur rétablissement, nous avons reçu des Etats-Unis d'Amérique, grâce à l'amabilité des D<sup>rs</sup> R. R. Parker, F. C. Robbins et N. H. Topping, que nous sommes heureux de remercier ici, trois antigènes préparés avec *Rickettsia burneti* (un antigène préparé avec la souche australienne de la fièvre « Q », un antigène préparé avec la souche américaine et un antigène préparé avec la souche italienne Henzerling). Avec ces antigènes nous avons exécuté la séro-réaction de fixation du complément selon la méthode de Ida A. Bengtson (2).

Les malades ont été saignés le 3 mai et, en employant la dilution de 1/64-1/128 de leur sérum, nous avons obtenu une réaction positive avec l'antigène préparé avec la *Rickettsia burneti*, souche australienne. La réaction de fixation du complément a été également positive avec la souche isolée par nous en Roumanie chez les malades de Constantza. Avec les autres antigènes, les réactions ont été négatives. Les réactions témoins pratiquées avec le sérum des individus normaux ou des individus souffrant d'autres affections ont été négatives.

Les réactions de fixation du complément, le comportement des cobayes inoculés avec la souche isolée en Roumanie, nous amènent à conclure que la nouvelle rickettsiose identifiée en Roumanie est identique à la fièvre « Q » australienne.

(Travail de l'Institut de Sérologie (D<sup>r</sup> I. Cantacuzino) et du Laboratoire de Pathologie générale de la Faculté de Médecine de Bucarest.)

## LES FILTRATS DES CULTURES EN BOUILLON DE *PASTEURELLA* DE DIFFÉRENTES ORIGINES ONT LA MÊME TOXICITÉ QUE LES LYSATS PENICILLINIQUES DE CES CULTURES

par N. STAMATIN, M<sup>lle</sup> C. SERBANESCU et M<sup>lle</sup> M. VLADEANU.

Dans une note précédente (1) nous avons montré que les lysats pénicilliniques des cultures de *Past. avicida* sont toxiques pour le lapin. En effet, injectés à doses convenables et par voie veineuse, ils provoquent des troubles respiratoires graves qui amènent souvent la mort de l'animal peu de temps après leur inoculation. La mort est constamment précédée d'une leucopénie sévère et l'examen nécropsique montre que les leucocytes qui disparaissent du sang périphérique se trouvent, d'habitude, bloqués dans les capillaires et les veines des poumons. La

(2) A. Ida BENGTON, *Publ. Health Rep.*, 1944, 59, 402.

(1) N. STAMATIN, M<sup>lle</sup> C. SERBANESCU et M<sup>lle</sup> M. VLADEANU, *C. R. Acad. Sci.*, 1948, 226, 2022.



mort semble être due en grande partie à l'asphyxie provoquée par ce blocage. L'accumulation des leucocytes dans les vaisseaux des poumons ne peut s'expliquer que par le pneumotropisme de la toxine des *Pasteurella* et c'est pour cette raison que nous avons donné à ce principe le nom de « toxine pneumotrope ».

La toxine pneumotrope qu'on trouve dans les lysats pénicillinniques n'existe-t-elle pas aussi dans les filtrats des cultures de *Pasteurella*? Le principe toxique est-il intimement lié à la cellule bactérienne et ne peut-il être libéré que par sa désintégration, ou est-il mis en liberté par la cellule au cours de sa multiplication? Pour répondre à ces diverses questions, nous avons essayé l'activité des filtrats des cultures en bouillon de *Pasteurella*.

*Expérience* : La souche de *Past. avicida* « Cluj II » est ensemencée en plusieurs flacons au bouillon peptoné à pH = 7,5. Les flacons sont incubés à 37° et la culture de chaque flacon est passée sur filtre Seitz. La culture d'un premier flacon est filtrée après quatre heures d'étuve, celle du deuxième après vingt-quatre heures, celle du troisième après quatre jours et, enfin, celle du quatrième après onze jours. Chaque filtrat, ainsi obtenu, est injecté, par voie veineuse et à la dose de 2 cm<sup>3</sup> au lapin, animal de choix pour de telles épreuves.

Le filtrat de la culture âgée de quatre heures n'a provoqué chez le lapin ni symptômes cliniques, ni leucopénie. Mais, trois heures après l'administration de la substance, on a remarqué une légère leucocytose qui s'est accentuée le lendemain (27.000 éléments par mètre cube) pour disparaître le quatrième jour.

Les filtrats des cultures âgées de un, quatre et onze jours, furent tous toxiques pour le lapin, le tuant respectivement seize heures, quarante-cinq minutes et trente minutes après l'administration. La mort est précédée d'une leucopénie sévère et de troubles respiratoires graves. Ces résultats montrent donc que les filtrats ont la même toxicité que les lysats et que les principes toxiques sont élaborés par les germes dans le milieu de culture. La toxine pneumotrope est donc un principe soluble se comportant, de ce point de vue, comme les exotoxines.

Dans d'autres expériences, nous avons essayé de préciser la toxicité pour le lapin des filtrats obtenus à partir des souches de *Pasteurella* isolées de diverses espèces animales ou ayant une virulence variable. Les résultats de ces essais ont montré que la substance toxique que nous avons trouvée dans les cultures des souches de *Past. avicida* existe aussi dans les filtrats des cultures des souches de *P. bovisseptica*, *P. suilla* et *P. cuniculicida*. Les souches de *Pasteurella* animales ne se distinguent guère de ce point de vue. De même, la virulence de la souche n'est pas en relation avec leur toxicité. Les souches très virulentes ainsi que les souches peu ou pas pathogènes fournissent des filtrats ayant, en règle générale, la même activité. Il est vrai que les filtrats obtenus de cultures en bouillon des diverses souches n'ont pas toujours la même activité, mais ces différences ne sont pas en relation avec l'origine ou la virulence de la souche.

*Conclusions.* — Les filtrats des cultures en bouillon des souches de *Pasteurella* de différentes origines, de même que les lysats pénicillinniques, sont toxiques pour le lapin lors de leur injection par voie veineuse. La toxicité des filtrats augmente avec l'âge de la culture. C'est ainsi que les filtrats d'une culture de quatre heures sont



dépourvus de toxicité apparente, mais ils provoquent de la leucocytose. Les filtrats provenant des cultures âgées de vingt-quatre heures ou plus tuent le lapin d'autant plus vite que la culture est plus âgée.

La substance toxique est mise en liberté par toutes les souches de *Pasteurella* isolées à partir des infections animales.

Il n'existe pas de relation directe entre la virulence d'une souche et sa toxicité. Une souche apathogène peut fournir un filtrat aussi actif qu'une souche très pathogène.

(Institut Pasteur de Bucarest, Roumanie.)

M. G. Girard : En accord avec notre collègue H. Jacotot, nous pensons qu'on ne saurait accepter sans réserve le « pneumotropisme » de la toxine pasteurellaire par le seul fait que son injection provoque une augmentation des leucocytes dans les capillaires pulmonaires.

D'autre part, la confusion des deux toxines (exo et endo) rend peu explicite le paragraphe qui précède les conclusions et imprécise ces conclusions.

L'intérêt du travail réside dans le fait que les auteurs ont obtenu la libération de principes toxiques des pasteurelles par la lyse pénicillinique.

## L'ACTIVITÉ PATHOGÈNE DE LA TOXINE DES *PASTEURELLA* POUR QUELQUES ESPÈCES ANIMALES

par N. STAMATIN, M<sup>lle</sup> SERBANESCU, et M<sup>lle</sup> M. VLADEANU.

Nous avons établi précédemment les conditions dans lesquelles on peut obtenir la toxine pneumotrope à partir des cultures en bouillon de *Pasteurella*, ainsi que l'action pathogène de ce produit lors de son injection par voie veineuse au lapin. En continuant nos recherches, nous avons administré la toxine par d'autres voies au lapin, ainsi que par différentes voies chez d'autres animaux d'expérience. Les résultats obtenus au cours de ces recherches font l'objet de cette note.

*Lapin.* — La toxine G<sub>2</sub> qui tue régulièrement le lapin à la dose de 2 cm<sup>3</sup> et par voie veineuse, fut injectée, à la dose de 4 cm<sup>3</sup>, et par voie sous-cutanée, au lapin. L'injection est suivie de la formation d'un œdème local qui disparaît en deux ou trois jours sans laisser de traces. On n'a pas observé d'autres manifestations cliniques, bien que le sang périphérique ait présenté d'importantes variations en ce qui concerne le nombre des leucocytes. Les voici :

Avant l'injection . . . . .	11.800
1 heure après . . . . .	5.600
3 heures après . . . . .	1.700
9 heures après . . . . .	24.000
24 heures après . . . . .	14.000
48 heures après . . . . .	9.000

Par voie dermique et à la dose de 2 cm<sup>3</sup>, la même toxine provoque chez le lapin un œdème et un érythème local, phénomènes qui disparaissent en deux ou trois jours.

Le *cobaye* n'est pas sensible. Il supporte, sans dommages, par voie veineuse, 1 cm<sup>3</sup> et par voie péritonéale 2 cm<sup>3</sup> de toxine.

La *souris* elle aussi est assez résistante. Par voie veineuse, elle supporte 0,1 et même 0,3 cm<sup>3</sup> de toxine. La dose de 1 cm<sup>3</sup> de toxine active, administrée par voie péritonéale, la tue irrégulièrement; la mort survient cinq à vingt-quatre heures après l'injection et elle est précédée de prostration.

La *poule*, bien que très sensible à l'action pathogène de *Past. qvicida*, supporte parfaitement sa toxine. La dose de 10 et même 20 cm<sup>3</sup> de toxine, administrée par voie veineuse ou péritonéale, provoque, quelques heures après, un état de somnolence qui disparaît le lendemain.

Le *mouton*, au contraire, est une des espèces sensibles. Les doses faibles (0,5 à 1 cm<sup>3</sup>) provoquent des troubles respiratoires plus ou moins graves, des troubles digestifs, de la fièvre (41° et même plus), de la torpeur, etc.; mais tout rentre dans l'ordre le lendemain. Les doses fortes (5 cm<sup>3</sup>) tuent l'animal en moins de vingt-quatre heures. A l'autopsie, on trouve des hémorragies sur la surface des poumons, infiltration périvasculaire, œdème et congestion toujours dans les poumons. Les lésions des autres organes sont peu manifestes et elles se traduisent surtout par des congestions. La toxine provoque chez le mouton, comme chez le lapin d'ailleurs, d'importantes modifications dans le nombre des leucocytes du sang. Voici les variations constatées chez un mouton qui fut injecté par voie veineuse à la dose de 1 cm<sup>3</sup> de toxine.

Avant l'injection . . . . .	11.400
4 heures après . . . . .	1.000
8 heures après . . . . .	3.400
24 heures après . . . . .	15.000
48 heures après . . . . .	27.000
72 heures après . . . . .	9.000

Le *veau* est aussi sensible à l'action nocive de la toxine pneumotrope mise en liberté par les *Pasteurella*. Un veau, âgé de quelques mois, est injecté par voie veineuse et à la dose de 5 cm<sup>3</sup> d'une toxine obtenue par filtration d'une culture en bouillon de la souche « S. 55 lapin ». Quinze minutes après l'administration du produit, on remarque déjà une accélération de la respiration. Les difficultés respiratoires s'accroissent vite et une heure après l'injection elles sont très graves. L'animal est couché, sa respiration est buccale et accélérée. Ces symptômes dramatiques durent quelques heures. Puis les troubles respiratoires commencent à diminuer et le lendemain l'état de l'animal est presque normal; il est un peu courbé, son poil est hérissé, mais il mange comme d'habitude. Dans le sang de l'animal on a constaté d'importantes variations en ce qui concerne le nombre des leucocytes. Les voici :

Avant l'injection . . . . .	12.200
30 minutes après . . . . .	4.200
75 minutes après . . . . .	3.000
2 heures après . . . . .	1.900
5 heures après . . . . .	7.000
9 heures après . . . . .	14.600
24 heures après . . . . .	27.000
48 heures après . . . . .	39.000
72 heures après . . . . .	11.600



Le chien est sensible à la toxine et une dose convenable peut le tuer. En voici un exemple : un chien de taille moyenne est injecté par voie veineuse à la dose de 5 cm<sup>3</sup> de toxine G<sub>2</sub>. Son état général devient mauvais peu de temps après cette administration. Il présente une dyspnée grave et il refuse constamment la nourriture. Son état continue à empirer et l'animal meurt trente-six heures après l'injection. A l'autopsie, on observe des hémorragies de dimensions variables sur la surface des poumons. Pendant la maladie, on a constaté des variations importantes dans le nombre des leucocytes du sang.

*Conclusions.* — La toxine pneumotrope, sécrétée par la *Pasteurella* animale, est particulièrement active pour le lapin, le mouton, le veau et le chien. La souris est peu sensible. La poule et le cobaye sont très résistants. La toxicité se traduit par des troubles respiratoires ainsi que par des variations importantes dans le nombre des leucocytes du sang.

(Institut Pasteur de Bucarest, Roumanie.)

Les communications suivantes ont paru ou paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

**Contribution à l'étude de *Sh. alkalescens*. Les caractères sérologiques**, par F. ROLAND, M<sup>lle</sup> D. BOURBON et P. THEBAULT.

**Lésions et réactions du tissu lymphoïde. I. Le tissu lymphoïde chez l'animal immunisé**, par A. DELAUNAY, M. DELAUNAY et J. LEBRUN.

**Contribution à l'étude de l'antigène thermostable du vibron cholérique. Applications pratiques de l'analyse antigénique O**, par J. GALLUT.

**La culture des bacilles tuberculeux à partir des produits pathologiques sur les milieux de Dubos et son intérêt dans le diagnostic de la tuberculose**, par Et. BERNARD, P. BRAUN et B. KREIS.

**La lyse bactériophagique par entraînement**, par R. WAHL et M<sup>me</sup> J. JOSSE-GOICHOT.

---

Le Gérant · G. MASSON.